

Aki Makkonen

# Asetyylikoliinisolujen, glutamaattisolujen ja DREADD-reseptorien samanaikainen tunnistaminen immunohistokemiallisesti

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Insinööri (AMK)

Bio- ja kemiantekniikka

Insinöörityö

19.4.2017

Tekijä(t) Otsikko Sivumäärä Aika	Aki Makkonen Asetyylikoliinisolujen, glutamaattisolujen ja DREADD-reseptorien samanaikainen tunnistaminen 34 sivua + 1 liite 19.4.2017
Tutkinto	Insinööri (AMK)
Koulutusohjelma	Bio- ja kemiantekniikka
Suuntautumisvaihtoehto	
Ohjaaja(t)	Dosentti Teemu Aitta-Aho Lehtori Tiina Soininen
<p>DREADD-reseptorit ovat uusia synteettisiä reseptoreita, joita voidaan aktivoida synteettisillä ligandeilla. Niitä voidaan käyttää käyttäytymiskokeissa, joissa halutaan selvittää tiettyjen yksittäisten hermosoluryhmien vaikutusta käytökseen. Käyttäytymiskokeiden tuloksia ei voida kuitenkaan tulkita, ellei varmistuta siitä, missä soluissa DREADD-reseptorit ovat ilmentyneet. Tämän takia on kriittistä kehittää menetelmiä, joilla voidaan varmistaa DREADD-reseptorien sijainti tietynlaisissa hermosoluissa.</p> <p>Insinöörityössä tavoite oli kehittää vasta-ainevärjäykseen perustuva menetelmä glutamatergisten solujen, kolinergisten solujen ja DREADD-reseptorien samanaikaiseksi tunnistamiseksi hiirten aivoista. Tämä oli tärkeää, jotta käyttäytymiskokeiden tuloksia voitiin tulkita.</p> <p>DREADD-vektoreita oli injektoitu 25 hiiren aivoihin, tarkoituksena saada aikaan DREADD-reseptorien ilmentämistä pedunkulopontisen tumakkeen glutamaattisoluissa. Insinöörityössä käyttäytymiskokeissa käytettyjä hiiriä perfusoiitiin ja niiden aivot otettiin talteen. Aivot jäädettiin ja niistä tehtiin leikkeitä kryostaatilla. Aivoleikkeille tehtiin immunohistokemiallista vasta-ainevärjäystä kolmella erilaisella vasta-aineella. Värjättyjä aivoleikkeitä kuvanettiin fluoresenssimikroskoopilla.</p> <p>Insinöörityön lopputuloksena ei saatu luotua täysin toimivaa kolmoisvärjäysmenetelmää.</p> <p>Insinöörityössä saatiin kuitenkin kaksi vasta-ainetta toimimaan samanaikaisesti siten, että VGLUT2- ja mCherry-vasta-aineet toimivat samanaikaisesti sekä ChAT- ja mCherry-vasta-aineet toimivat yhdessä. Toimivaa kaksoisvärjäystä voidaankin käyttää samoihin tarkoituksiin kuin alkuperäisenä tavoitteena ollut kolmoisvärjäystä. Sen avulla voidaan arvioida DREADD-injektoiden osumista oikealle aivoalueelle ja DREADD-reseptorien päätymistä glutamaattisoluihin.</p>	
Avainsanat	glutamatergiset solut, kolinergiset solut, DREADD-reseptorit, immunohistokemia, fluoresenssi

Author(s) Title	Aki Makkonen Simultaneous identification of cholinergic neurons, glutamatergic neurons and DREADD-receptors
Number of Pages Date	34 pages + 1 appendice 19 April 2017
Degree	Bachelor of Engineering
Degree Programme	Biotechnology and Chemical engineering
Specialisation option	
Instructor(s)	Teemu Aitta-Aho, Docent Tiina Soininen, Senior Lecturer
<p>DREADD receptors are new synthetic receptors that can be activated with synthetic ligands. They can be used in behavioral tests, the purpose of which is to determine the connection between neuron groups and behavior. However, the results of behavior tests can only be used when the DREADD receptors can be located in specific neuron cell groups. For this reason, it is critical to develop methods to confirm the location of DREADD receptors inside certain neurons.</p> <p>In this thesis, the goal was to create a method of identification for glutamatergic neurons, cholinergic neurons and DREADD receptors in the brain, using immunohistochemical staining.</p> <p>DREADD vectors were injected in 25 mice, with the goal of DREADD receptor expression in the glutamatergic neurons of pedunculo pontine nucleus. In this thesis, mice used earlier in behavioral experiments were perfused and their brains were collected. The brains were frozen and cut to sections with a cryostat. The sections were then immunohistochemically stained with three different markers. The stained sections were imaged with fluorescence microscope.</p> <p>The results showed that the triple staining method was not fully functional</p> <p>However, this thesis succeeded in creating a functional double staining for all the used markers. The functional double staining method can be used for the same purposes as the original goal of triple staining. With double staining, it is possible to evaluate whether the injections were in the right area of the brain and whether the DREADD receptors are within the glutamatergic neurons.</p>	
eywords	glutamatergic neurons, cholinergic neurons, DREADD-receptors, immunohistochemistry, fluorescence

## Sisällys

### Lyhenteet

1	Johdanto	1
2	Teoria	2
2.1	Aivot	2
2.2	DREADD-molekyylit	4
2.3	Glutamaatti ja glutamaattisolut	4
2.4	Asetyylikoliini ja asetyylikoliinisolut	6
2.5	Immunohistokemia	7
2.6	Fluoresenssikuvantaminen	15
3	Työn suoritus	17
3.1	Näytteiden keräys	17
3.2	Immunohistokemiallinen värjäys	19
3.3	Mikroskopiointi	21
4	Tulokset ja niiden tarkastelu	21
4.1	Neuronien värjäytyminen	23
4.2	Menetelmän optimoinnin tulokset	27
5	Tulosten luotettavuus	30
6	Päätelmät	32
	Lähteet	34

### Liitteet

Liite 1. Käytetyt reagenssit ja vasta-aineet

## Lyhenteet

ChAT	koliiniasetyyylitransferaasi. Asetyylikoliinia katalysoiva entsyymi.
CNO	klotsapiini-N-oksidi. DREADD-reseptoreita aktivoiva ligandi.
DREADD	Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs. Eksogeenisistä ligandeista aktivoituva reseptori.
PBS	Fosfaattipuskuri.
PFA	Paraformaldehydi. Kestävöimiseen käytetty reagenssi.
PPT	Pedunkulopontinen tumake. Alue aivoissa.
VGLUT2	Vesikulaarinen glutamaattikuljettaja.

## 1 Johdanto

Hiirille voidaan tehdä käyttäytymiskokeita, joissa tavoitteena on tutkia, miten aivon toiminta vaikuttaa käyttäytymiseen. Hiirillä voidaan esimerkiksi tutkia huumeriippuvuutta ja siihen liittyvää käyttäytymistä. Haasteena on ollut käyttäytymismallien yhdistäminen tiettyihin neuroniryhmiin aivoissa. Aikaisemmin ei ole ollut nykyisenkaltaisia menetelmiä aktivoida ulkoisesti tiettyjä haluttuja hermosoluryhmiä. Nykyään on kuitenkin kehitetty uudenlaisia molekyyliä, jotka mahdollistavat yksittäisten hermosoluryhmien aktivoinnin ulkoisesti. DREADD-molekyylit, eli Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs, ovat uusia suunniteltuja reseptoreita, joita voidaan käyttää muun muassa käyttäytymiskokeissa haluttujen hermosoluryhmien aktivointiin. Näiden uusien molekyylien avulla voidaan tutkia hermosoluryhmien ja käyttäytymisen välistä suoraa yhteyttä ja kerryttää tietopankkia siitä, miten eri neuronit vaikuttavat.

Aivotutkimuksessa tärkeänä päämääränä onkin selvittää erillisten soluryhmien vaikutukset. Mikäli voidaan kartoittaa tarkasti, mitä mitäkin soluryhmä kontrolloi, voidaan tulevaisuudessa kehittää täsmälääkkeitä, jotka vaikuttavat vain tarpeelliseen soluryhmään. Täsmälääkkeiden avulla voidaan antaa isompia lääkemannoksia ja niillä on mahdollisesti vähemmän haittavaikutuksia. DREADD-reseptorit auttavat tässä, sillä ne mahdollistavat paikallisen ja väliaikaisen G-proteiini signaalien ohjauksen *in vivo*. Käytännössä tämä tarkoittaa sitä, että DREADD-reseptorit mahdollistavat tiettyjen soluryhmien aktivoimisen ulkoisesti. DREADD-reseptorit aktivoidaan endogeenisillä ligandeilla, jotka ovat muuten farmakologisesti inertejä. Yleisesti käytetty ligandi on klotsapiini-N-oksidi (CNO) [1, s. 936.]

Käyttäytymiskokeiden jälkeen on kriittistä varmistua siitä, missä neuroneissa DREADD-reseptoreiden ilmentymistä on tapahtunut. Tämän avulla voidaan varmuudella yhdistää havaittuja käyttäytymismalleja tutkittuihin neuroneihin. Ilman käyttäytymiskokeiden jälkeen suoritettua hermosolujen kartoitusta tutkimuksen tuloksista ei voida vetää minkäänlaisia johtopäätöksiä. Yksi tapa varmistaa DREADD-reseptorien sijainti tietyissä hermosoluissa on käyttää immunohistokemiallisia menetelmiä ja vasta-aineväryäystä.

## Insinööriyön tavoite

Käyttäytymiskokeissa hiirten aivoihin oli injektoitu vektoreilla DREADD-geenejä. Transduktion jälkeen solut saatiin ilmentämään DREADD-reseptoreita. Tarkoituksena oli osua pedunkulopontisen tumakkeen alueelle ja saada glutamaattisolut infektoitua virusvektoreilla. Tarpeelliseksi nousi kehittää menetelmä, jolla voitaisiin varmistua DREADD-reseptorien sijainnista. Kolinergiset solut haluttiin tunnistaa samanaikaisesti, sillä pedunkulopontinen tumake usein määritellään kolinergisten solujen levinneisyyden mukaan.

Tässä työssä tarkoituksena oli kehittää immunohistokemiallinen kolmoisvasta-aineväryjäys. Toimivan kolmoisvasta-aineväryyksen avulla voitaisiin arvioida DREADD-injektoiden osumista oikealle aivoalueelle ja DREADD-reseptorien päätymistä glutamaattisoluihin. VGLUT2-vasta-aine oli käytössä glutamaattisolujen tunnistamiseksi, mCherry-vasta-aine DREADD-reseptorien tunnistamiseksi ja ChAT-vasta-aine kolinergisten solujen tunnistamiseksi.

Insinööriyössä tärkeänä osana oli aivojen hermosolujen tunnistus, niiden reseptorien ymmärtäminen ja mahdolliset markkerit niille. Aivoanatomian tuntemusta tarvittiin tulosten tulkintaan. Itse kokeellinen työ tehtiin immunohistokemiallisin keinoin ja tulosten tulkintaan käytettiin fluoresenssikuvantamista.

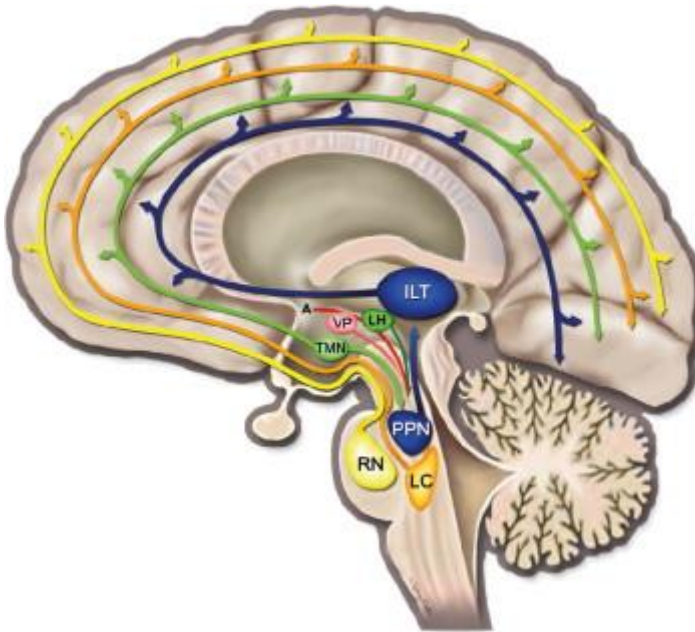
## 2 Teoria

### 2.1 Aivot

Aivot ovat monimutkainen ja vielä hyvinkin vähän tunnettu elin. Aivojen tutkimusta vaikeuttaa selvien rakenteiden vähäisyys. Aivot muodostuvat erilaisista neuroneista, jotka viestivät keskenään synapsien avulla. Aivot on jaoteltu erilaisiin anatomisiin alueisiin niiden toimintojen mukaan. Erilaisten aivoalueiden erottaminen ei kuitenkaan ole yhtä yksiselitteistä kuin erottaa esimerkiksi eri elimiä toisistaan.

PPT-aivoalue on yksi pääkomponenteista retikulaarisessa aktivaatiosysteemissä ja keskiaivojen lokomotorisessa alueessa. Se osallistuu hereillä olon säätelyyn ja vaikuttaa siirtymään unen ja hereillä olon välillä. Sillä on tärkeä rooli liikkumisessa, autonomisissa ja motorisissa funktioissa ja se vaikuttaa oppimiseen sekä käyttäytymiseen. Se sijoittuu

aivojen takaosan aivorunkoon. Kuvassa 1 on esitetty PPT-alueen sijainti ihmisen aivoissa. PPT-alueelta ulottuu aksoneita aina etuaivokuoresta *thoracic segmenttiin* asti. Näiden projektioiden lisäksi PPT-alueella on suuri määrä keskinäisiä yhteyksiä basaali-ganglioihin. Anatomiset, fysiologiset ja käyttäytymiskokeissa saadut todisteet viittaavat siihen, että PPT-aluetta ja basaaliganlioita voitaisiin pitää yhtenä toimivana yksikkönä. [2.] Basaaligangliat sijaitsevat PPT-alueen yläpuolella, kuvassa 1 ne on merkitty ILT-lyhenteellä.



Kuva 1. Ihmisen aivot kuvattuna sivulta päin. PPT-alue on merkitty kuvaan PPN-lyhenteellä, joka on toinen alueesta käytetty lyhenne. [3.]

PPT-alueen on perinteisesti ajateltu olevan kriittinen osa keskiaivojen lokomotorista aluetta ja vaikuttavan merkittävästi askellukseen. Tutkijat esittivät kuitenkin vuonna 2016, että pedunkulopontisen tumakkeen rooli liikkumisessa ei ole askelluksen koordinointi, vaan toiminta-tulos yhdistelmien tekeminen ja päätöksenteko. Pedunkulopontinen tumake ei siis suoraa kontrolloisi askellusta, vaan se tekisi nopeita päätöksiä liikkumiseen liittyen. Sen rooli olisi siis enemmänkin reagoida toimintoihin ja toimintojen yhdistäminen haluttuun lopputulokseen. PPT-elimellä on huomiokyvyllisiä ja sensorisia toimintoja, jotka mahdollistavat nopeat toimintapäätökset tarvittaessa. Uudempien eläinkokeiden perusteella PPT-alueen menettäminen ei kuitenkaan huononna liikkumista. [4, s. 617.]



PPT-alue koostuu suuresta määrästä erilaisia hermosoluja. Noin 50 % sen hermosoluista on kolinergisiä hermosoluja. PPT-alueen ääriiivat on perinteisesti määriteltä kolinergisten hermosolujen mukaan. Muista hermosoluista ja siitä, vaikuttaako niiden sijainti PPT-elimien ääri rajojen määritelmään yhtä selvästi kuin kolinergisten solujen sijainti, tiedetään vain vähän.

## 2.2 DREADD-molekyylit

DREADD-molekyylit, eli Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs, ovat reseptoreita, jotka on suunniteltu aktivoitumaan vain synteettisten ligandien vaikutuksesta. Ne ovat muokattuja asetyylikoliinin muskariinityypin G-proteiinikytkentäisiä reseptoreja. Ne viedään soluihin yleensä virusvektoreilla. DREADD-molekyylit kehitti Bryan Roth ja kumppanit vuonna 2007. [5, s. 656.]

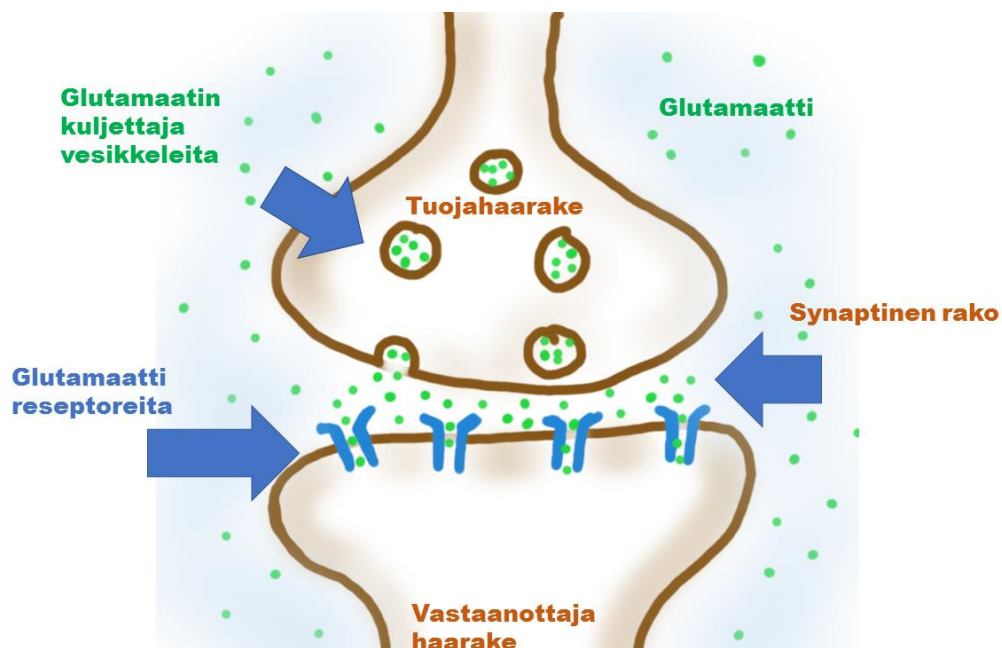
DREADD-teknologiaa on käytetty monenlaisten solujen aktiivisuuden kontrollointiin. DREADD-aktiivisuutta voidaan kohdistaa selektiivisesti tiettyihin soluryhmiin käyttämällä soluryhmille tyypillisiä promoottoreja ohjaamaan DREADD-ilmentämistä. CNO-ligandien vaikutus DREADD-reseptoreihin riippuu siitä, mihin signaalikaskadiin se on pariutunut. DREADD-reseptorit voivat ilmentyä kiihdyttävissä tai vaimentavissa signaalikaskadeissa. [5, s. 656.]

DREADD-reseptorien tunnistamiseksi niihin voidaan liittää helposti tunnistettavia molekyylejä. mCherry-proteiinia voidaan käyttää tähän. mCherry-proteiini on monoklonaalinen fluoresoiva proteiini, jota on käytetty myös nesteiden virtauksen seuraamiseen. DREADD-reseptorit voidaan löytää helposti käyttämällä niihin liitetyn mCherry-molekyylin spesifisiä vasta-aineita, joita löytyy usealta valmistajalta.

## 2.3 Glutamaatti ja glutamaattisolut

Glutamaattisolut ovat pieniä 10–20 mikrometrin kokoisia hermosoluja, jotka aktivoituvat glutamaatin vaikutuksesta. Yksi glutamaattisolujen päätehtävistä on säädellä aivojen synaptista plastisuutta, joka on tärkeää oppimisen ja muistamisen kannalta. [6, s. 404.] Glutamaattireseptoreita on tunnistettu nisäkkäiltä yli 20 erilaista. Glutamaattireseptoreita on vastaanottajahaarakkeiden solujen dendriiteissä, jossa ne aktivoituvat synaptiseen

rakoon vapautuneesta glutamaatista. Tätä on havainnollistettu kuvassa 2. Glutamaatti-reseptorit voidaan jakaa kahteen pääryhmään: Ionotroppisiin, joissa viestin kuljettajana ovat ionit, ja metabotropisiin, joissa viestin kuljettajina ovat toisiolähetit G-proteiinien välityksellä. Kummatkin ryhmät voidaan jakaa kolmeen tyyppiin, riippuen niiden sitoutumisesta, ionien läpäisevyydestä, sähkönjohtavuudesta ja muista tekijöistä. Nämä ryhmät voidaan edelleen jaotella useisiin alaryhmiin. [7, s. 657.] Ionotropiset reseptorit ovat nopeita ja reagoivat välittömästi, kun taas metabotropiset glutamaattireseptorit toimivat hitaammin.



Kuva 2. Glutamaattisolun toiminta. Kuvassa näkyy tuojahaarake, joka kuljettaa glutamaattivesikkeleitä synaptiseen rako, jossa ne päätyvät vastaanottajahaarakkeen glutamaattireseptoreihin ja aktivoivat glutamaattisolun.

Glutamaatti on glutamiinihapon anionimuoto. Sen tärkeä merkitys nisäkkäiden aivojen toiminnalle on ymmärretty vasta suhteellisen vähän aikaa sitten. Se on selkärankaisten hermoston pääasiallinen kiihdyttävä välittäjäaine. Siksi onkin loogista, että sitä on myös kaikista aminohapoista eniten ihmisen hermostossa. [8.] Glutamaattia voidaan syntetisoida metabolisoimalla glutamiinia glutaminaasin avulla presynaptisissa terminaaleissa. Glutamiinia voidaan myös syntetisoida transaminoimalla 2-oksoglutaraattia. Glutamiinia voidaan myös pilkkoa takaisin glutamaatiksi. Glutamiinisyntetaasi katalysoi tätä pilkkomista.

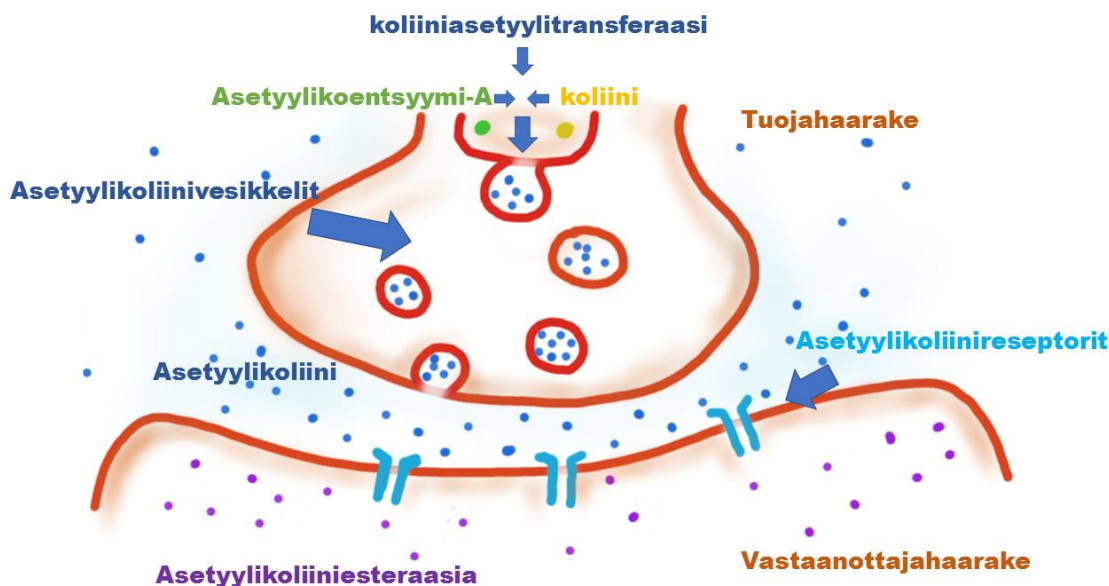
Glutamaatin suuren konsentraation ja mahdollisen eksitotoksisuuden takia vaaditaan suurta fysiologista säätelyä glutamaattitasoihin ja reseptorien viestintään, jotta vältetään eksitotoksisuudelta, mutta saavutetaan silti halutut kiihdyttävät aivosignaalit. Tämän kontrollin saavuttamiseksi hermostoon on syntynyt monimutkaisia säätelysysteemejä. Ne säätelevät tarkasti glutamaatin pilkkoutumista, vapautusta ja reseptorien viestintää. [6, s. 412.]

Glutamaattisoluja voidaan tunnistaa spesifisten markkerien avulla, joita voivat olla jotkin glutamaattisoluihin sijaitsevat rakenteet tai entsyymit. Markkerit voidaan tunnistaa esimerkiksi niiden spesifisten vasta-aineiden avulla. Käytettyjä markkereita glutamaattisoluille ovat vesikulaariset glutamaattikuljettajat, glutamaattisolun reseptorit, glutaminyntetaasi ja glutaminaasi. Näiden markkereiden tunnistamiseen on saatavilla kaupallisia vasta-aineita. Vasta-aineita voidaan myös valmistaa itse laboratorioissa.

## 2.4 Asetyylikoliini ja asetyylikoliinisolut

Asetyylikoliinisoluja löytyy keskushermostosta ja ääreishermostosta. Ne ovat levittäytyneet monille eri alueille aivoissa, selkäytimessä ja verkkokalvoilla. Ne vaikuttavat oppimiseen, muistamiseen, liikkumiseen ja näkemiseen [9.] Asetyylikoliinisolut viestivät asetyylikoliinin avulla. Asetyylikoliinin syntetisoinnista vastuussa olevan koliiniasetyylitransferaasin läsnäolo solussa määrittelee sen asetyylikoliinisoluksi [10, s. 396.] Asetyylikoliinisoluja kutsutaan kolinergisiksi hermosoluiksi.

Asetyylikoliini on etikkahapon ja koliinin esteri. Se toimii välittäjäaineena keskushermostossa ja ääreishermostossa. ChAT-entsyymi, eli koliiniasetyylitransferaasi, on transferaasientsyymi, joka on vastuussa asetyylikoliinin synteesistä. ChAT-entsyymi katalysoi asetyyli-ryhmän siirtymistä asetyylikoentsyymi-A:sta, eli etikkahaposta, koliiniin, tuottaen asetyylikoliinin. Suurin osa asetyylikoliinista syntetisoidaan paikallisesti hermoterminealeissa. [9.] Asetyylikoliinin syntetisoinnin jälkeen se varastoidaan vesikkeleihin. Asetyylikoliiniesteraasi pilkkoo asetyylikoliinia asetaatiksi ja koliiniksi. Sitä löytyy hermosynapseista ja hermo-lihasliitoksista. Kuvassa 3 näkyy asetyylikoliinin muodostuminen ja sen kulkeutuminen koliinireseptoreihin.



Kuva 3. Asetyylikoliinisolujen toiminta yksinkertaistettuna. Asetyylikoliini muodostuu hermoterminaalissa asetyylikoentsyymi-A:sta ja koliinista koliiniasetyylitransferaasin avulla. Sieltä se varastoidaan vesikkeleihin, joissa se kulkeutuu synapsirakoon ja vastaanottajahaarakkeen asetyylikoliinireseptoreihin.

Kolinergisten solujen markkereina voidaan pitää koliiniasetyylitransferaasia, asetyylikoliinin kuljettajavesikkeleitä ja asetyylikoliiniesteraasia. Kaikkiin näihin markkereihin on saatavilla kaupallisia vasta-aineita.

## 2.5 Immunohistokemia

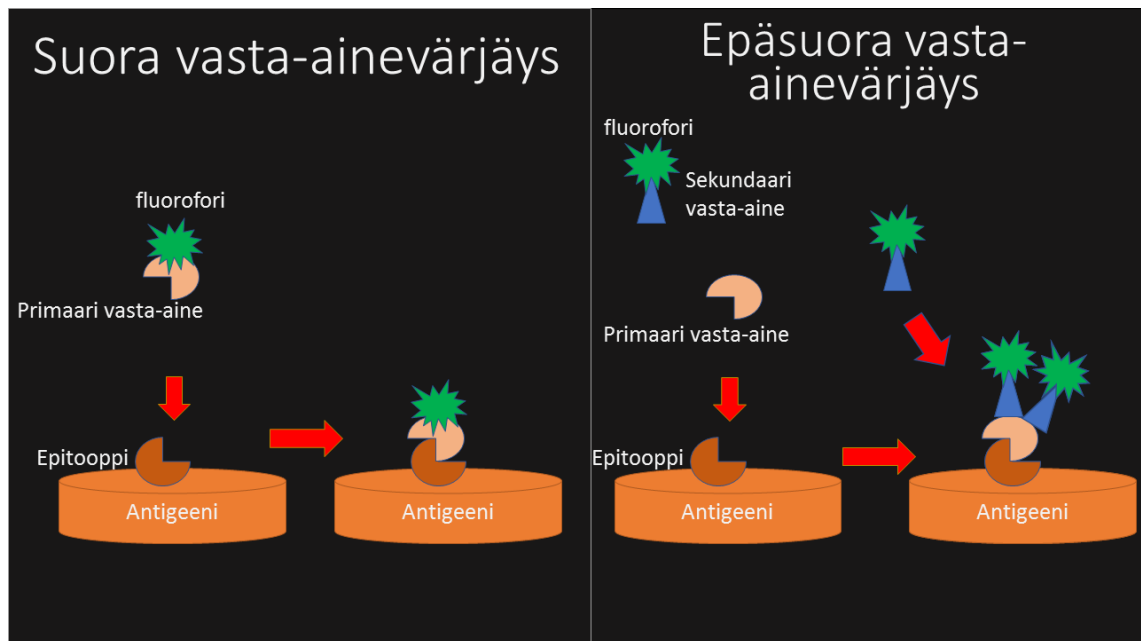
Immunohistokemia yhdistää anatomisia, immunologisia ja biokemiallisia tekniikoita halettujen kudoksen komponenttien tunnistamiseksi leimattuja vasta-aineita käyttäen. Immunohistokemia mahdollistaa spesifien solujen osien tunnistamisen paikallisesti ja oikeassa kontekstissa oikealla kudoksella. Immunohistokemiaa on käytetty 1940-luvulta asti. Sitä voidaan käyttää niin tautien diagnosointiin, lääkkeiden kehitykseen kuin myös biologiseen tutkimukseenkin.

Tutkittava kudos voidaan leikellä leikkeiksi, tai tutkia kokonaisena, riippuen tutkimuksesta. Leikattava leikkeet ovat tyypillisesti muutamasta mikrometrinä ylöspäin. Kudok-

sille voidaan tehdä vasta-ainevärjäys leikkauksen jälkeen. Käytettävät vasta-aineet voivat olla polyklonaalisia tai monoklonaalisia. Polyklonaaliset vasta-aineet ovat heterogeeninen sekoitus vasta-aineita ja ne sitoutuvat useampiin eri epitoppeihin. Monoklonaaliset vasta-aineet sitoutuvat vain yhteen tiettyyn epitoppiin [11.]

Valinta polyklonaalisten ja monoklonaalisten vasta-aineiden välillä täytyy tehdä tapauskohtaisesti. Kummassakin on etunsa ja haittansa. Polyklonaaliset vasta-aineet voivat tuottaa paremman signaalin, sillä ne voivat sitoutua useampiin epitoppeihin. Ne eivät myöskään ole niin herkkiä antigeeneissä tapahtuneille muutoksille, joita syntyy kestävässä kudosta. Niiden huonona puolena on suurempi taustakohina kuvantaessa ja suurempi varianssi eri erien välillä. Monoklonaalisten vasta-aineiden puolesta puhuu pienempi varianssi erien välillä ja pienempi taustakohina kuvantaessa. Huonona puolena on suurempi herkkyys antigeenien muutoksille. [11.]

Immunohistokemiallinen vasta-ainevärjäys voi olla joko suora tai epäsuora. Kuvassa 4 on esitetty suora ja epäsuora värjäys. Suorassa värjäyksessä leimattu vasta-aine kiinnittyy suoraan etsittyyn antigeeniin. Epäsuorassa menetelmässä leimaamaton primaarinen vasta-aine kiinnittyy etsittyyn antigeeniin. Tämän jälkeen leimattu sekundaarinen vasta-aine kiinnittyy primaariseen vasta-aineeseen. Suora menetelmä vaatii vähemmän työvaiheita ja on täten nopeampi. Epäsuorassa menetelmässä saadaan vahvempi signaali, sillä primaariseen vasta-aineeseen voi sitoutua useita leimattuja sekundaarisia vasta-aineita.



Kuva 4. Vasemmalla puolella on esitetty suora vasta-ainevärjäys ja oikealla puolella epäsuora.

Immunohistokemiallisia värjäyksiä tarkastellaan tyypillisesti mikroskoopilla. Fluoresenssileimaa käytettäessä kuvannetaan värjäytyt kudokset fluoresenssimikroskoopilla.

### Perfuusio

Jotta immunohistokemiallinen värjäys olisi mahdollista täytyy tutkittava eläin ensin käsitellä, eli perfusoida, siten, että värjäys on mahdollista. Perfuusiosta eläin tyhjenetään verestä ja sen kudokset kestäväidään PFA-liuoksella (paraformaldehydiliuos) siihen tilaan, jossa ne olivat eläimen ollessa elossa. Veri poistetaan, koska punasolut autofluoresoivat, joten ne häiritsevät vasta-ainevärjäyksiin perustuvia metodeja. [12]. Perfuusio suoja aivoja kuoleman jälkeisiltä muutoksilta. Ennen perfuusion aloitusta eläin tulee nukkua ja nukuksen syvyys tulee varmistaa kipuvasteen puuttumisella.

PFA-käsittely säilyttää kudosten proteiinien sekundääri- ja tertiäärirakenteet muuttumattomina, tehden kudoksista kimmoisia ja paremmin kestäviä. PFA-liuoksen aktiiviset ainesosat ovat formaldehydi ja metyleeniglykoli. PFA-käsittelyn vaikutus perustuu molekyylien sisäisten ja molekyylien välisten ristsidoksien muodostumiseen. Pääsidokset muodostuvat aminohappo lysiinin sivuketjujen välillä muodostaen metyyli-siltoja. Ristsidoksia voi kuitenkin myös muodostua aminohydroksimetyyliryhmien ja fenolin välille. [13, s. 12.]

## Kudosten esikäsittely

Ennen leikkeiden värjäystä ne tulee vielä esikäsitellä. Niille tehdään jäätymissuojaus ja ne jäädytetään. Tämän jälkeen ne voidaan leikata leikkeiksi, jotka värjätään.

Perfusoidut aivot jäätymissuojataan pitämällä niitä yön yli 30-prosenttisessa sokeriliuoksessa, jonka tilavuus on vähintään 10 kertaa aivojen tilavuus. Suurempi tilavuus on tarpeen, jotta liuoksen konsentraatio ei muuttuisi merkittävästi käsittelyn aikana. 30-prosenttinen sokeriliuos poistaa aivojen kudoksista vettä, kunnes aivojen ja sokeriliuoksen osmoottinen paine on sama. Sokerikäsitteleminen pienentää jäädytyksen aikana syntyvää osmoottista shokkia. Kudoksiin muodostuu vähemmän jäätymisartefakteja ja niiden morfologia pysyy muuttumattomana. Jäätymisartefaktit, ja muuttunut morfologia vaikeuttavat tuloksien tarkastelua.

Aivot jäädytetään, jotta ne säilyisivät pidempään. Toinen säilömismenetelmä on säilöä näytteet parafiiniin. Usein aivot jäädytetään ja säilötään -80 °C:ssa, mikäli niitä säilytetään useampia kuukausia. Lyhytaikaisempaan säilytykseen riittää -20 °C. Jäähdytys tulee tehdä siten, että aivot jäätyvät tasaisesti. Mikäli jäätyminen on epätasaista saattaa aivojen morfologia kärsiä, tai ne voivat haljeta kokonaan.

## Kudosleikkaus

Viimeinen vaihe ennen kuin näytteet voidaan värjätä, on niiden leikkaaminen leikkeiksi. Leikkeet tehdään käyttäen kryostaattileikkureita. Leica CM3050 on tutkimuskäyttöön tehty motorisoitu kryostaattileikkuri, joka soveltuu erinomaisesti leikkeiden leikkaamiseen. Siinä on kylmäosasto ja jäähdytetty toimintopää. Kylmäosaston ja toimintopään lämpötilaa voidaan säätää näytteeseen sopivaksi. Kylmäosaston lämpötilaa voidaan säätää 0 °C ja -40 °C:n välillä, kun taas toimintopään lämpötila on säädettävissä -10 °C ja -50 °C:n välillä.

Aivot voidaan kiinnittää toimintopäähän kylmässä kovettuvalla kudosliimalla. Toimintopää on kryostaattileikkurin ainoa liikkuva osa. Toimintopää tekee litteän ellipsin muotoista liikettä ja liikuttaa näytteen leikkaavan terän ohi. Terä leikkaa näytteestä leikkeen. Toimintopää liikkuu jokaisen kierroksen jälkeen säädetyssä etäisyyden verran eteenpäin, jolloin jokainen leike on yhtä paksu. Toimintopään asentoa voidaan säätää kolmessa eri

ulottuvuudessa. Myös leikkauskulmaa voidaan säätää. Kuvassa 5 näkyy kryostaatin kylmäosasto.



Kuva 5. Kryostaatin kylmäosasto. Kuvassa on leikattu yksi leike aivoista valmiiksi ja sitä ollaan siirtämässä kuoppalevyille pakkasnesteeseen. Kuvaan on merkitty toimintopää, johon on liimattu hiiren aivot kiinni kudoslaimalla, leikkurilasi ja terä. Kuvassa myös näkyy alakulmassa kuoppalevy, johon valmiit aivoleikkeet nostetaan siveltimillä.

Leikattu leike liukuu terän ja leikkurilasin väliin. Leikkurilasi voidaan avata ja leike ottaa talteen. Leikkurilasin tarkoitus on estää leikettä kiertymästä rullalle. Leikkaustoiminto voidaan tehdä käsin pyörittämällä kampea tai moottorikäyttöisesti. Moottoria käytettäessä voidaan leikkausnopeus vakiodia säätimestä. Moottorilla leikattaessa voidaan valita kolmesta erilaisesta leikkaustavasta. Joko moottori tekee yhden täyden leikkauskierroksen aina poljinta painettaessa, moottori ajaa vakionopeudelle leikkausta, kunnes poljinta painetaan uudestaan tai moottori liikkuu vain painettaessa poljinta pohjaan. Moottoritoimissa leikkaamisessa on etuina se, että silloin toistettavuus paranee. Jokainen leike leikataan samalla nopeudella. Se myös parantaa työergonomiaa.



## Vasta-ainevärjäys

Kun näytteet on leikattu leikkeiksi, ne voidaan värjätä. Vasta-ainevärjäys on immunohistokemian perustyökaluja. Sen avulla voidaan löytää tutkittavista kudoksista haluttuja soluja ja solurakenteita. Vasta-ainevärjäyksessä käytetään hyväksi vasta-aineiden ja antigeenien spesifisyyttä. Leimatut vasta-aineet sitoutuvat omien antigeeniensä kanssa. Sitoutumisen jälkeen voidaan mikroskoopilla löytää sitoutumiskohdat kudokselta ja tunnistaa solut tai solurakenteet.

Epäsuora vasta-ainevärjäys on kaksivaiheinen. Ensimmäisessä vaiheessa kudokseen pestään ja sille tehdään tarvittava esikäsittely. Esikäsittelyn ensimmäinen vaihe on antigeenien palautus toimintakykyisiksi. Perfusointi PFA-liuoksella muodostaa metyleenisiltoja, joista syntyy ristisidoksia proteiinien välillä. Ristisidokset voivat tukkia antigeenisia alueita. [14.] Ristisidoksia voi syntyä aminohappojen välillä epitoopissa tai epitoopin läheisissä peptideissä. Epitooppi voi estyä myös siitä syystä, että sen konformaatio on muuttunut, tai sen takia, että antigeenin elektrostaattinen jännite on muuttunut. [15.] Antigeenien palauttaminen toimintakykyiseksi tarkoittaa näiden muutosten kumoamista.

Antigeenien palautuksen tarpeellisuus riippuu käytetystä kestäväimismenetelmästä, sen kestosta, käytetystä vasta-aineesta, kohde antigeenistä ja kudostyypistä. Käytettäessä esimerkiksi ChAT-vasta-ainetta palautus on havaittu tarpeelliseksi, mutta mCherry-vasta-ainevärjäys ei vaadi antigeenien palautusvaihetta. ChAT-vasta-aineilla värjätessä aivoleikkeitä voidaan käyttää lämpöä epitooppien toimintakyvyn palauttamiseen. Lämpökäsittelyssä näyte on puskuriliuoksessa korkeassa lämpötilassa sopivan ajan. Korkea lämpö kumoaa kudoksessa kestäväimisen yhteydessä tapahtuneita muutoksia. Puskuriliuos estää pH:n muuttumista käsittelyn aikana. Optimaalinen pH, lämpötila ja käsittelyaika joudutaan selvittämään kokeellisesti riippuen käytetyistä menetelmistä.

## Esto eli blokkaukset

Ensimmäiseen vaiheeseen kuuluu myös vasta-aineiden epäspesifisen sitoutumisen esto. Sitoutuminen muualle kuin kohde-epitooppeihin johtaa kuvantaessa taustakohinaan ja huonontaa melu-signaali suhdetta. Se voi myös johtaa väärin positiivisiin tuloksiin tai vaikeuttaa tulosten tulkintaa.

Epäspesifit epitoopit tukitaan proteiineilla, jotta primaariset ja sekundaariset vasta-aineet eivät sitoutuisi kuin kohteisiinsa. Vasta-ainevärjäyksen onnistuminen riippuu spesifisestä vasta-aineiden sitoutumisesta tutkittaviin epitooppeihin. Niin spesifiseen kuin epäspesifiseenkin sitoutumiseen vaikuttavat hydrofobiset ja ioniset vuorovaikutukset, sekä vetysidokset ja muut molekyylien väliset voimat. Epäspesifinen sitoutuminen muihin kuin kohde-epitooppeihin on immunohistologiassa yleinen ongelma. [16, s. 242.]

Estoliuksen tarpeellisuus värjäyksessä on kuitenkin kyseenalaistettu. Vuonna 2011 julkaistussa tutkimuksessa tutkittiin perinteisesti immunohistokemiallisessa värjäyksessä kriittisenä vaiheena pidettyä epäspesifisen sitoutumisen estoa. Tutkijat eivät havainneet eroja estoliuksella käsiteltyjen näytteiden ja käsittelemättömien näytteiden välillä. Tutkijat sanovatkin, että nykyiset estomenetelmät perustuvat vanhentuneisiin ja ristiriitaisiin raportteihin. Estoliuos, joka koostuu naudan albumiseerumista, maidosta tai kaseiinista, voi jopa lisätä taustakohinaa. [17.]

Perinteisemmän tiedon mukaan estoliuksia tulee kuitenkin käyttää hyvien lopputuloksien saavuttamiseksi. Paras lopputulos saadaan, kun estoliuksessa käytetään saman isäntäeläimen seerumia kuin mistä sekundaariset vasta-aineet on kerätty. Tällöin se sitoutuu varmasti samoihin kohtiin kudoksella kuin leimatut sekundaariset vasta-aineet sitoutuisivat. Estoon ei saa kuitenkaan käyttää samasta eläimestä saatua seerumia kuin mistä primaariset vasta-aineet ovat, muuten ne eivät sitoudu. [16.] Naudan albumiseerumi on yleisesti käytetty estoon.

Estoliukseen lisätään usein myös solukalvon läpäisyä parantavia reagensseja. Käytettäessä vasta-aineita, jotka sitoutuvat solun sisällä oleviin epitooppeihin, on käytettävä aineita jotka parantavat solukalvon läpäisevyyttä. Asetonia ja metanolia voidaan käyttää solukalvon läpäisevyyden parantamiseksi. Ne ovat kuitenkin myrkyllisiä, joten nykyään käytetään useammin Triton x-100:aa, joka on myrkytön, ei-ioninen detergentti.

#### Autofluoresenssin vähentäminen

Kudoksissa on usein autofluoresenssia. Autofluoresenssi voi aiheuttaa merkittävää taustakohinaa. Tämä voi nousta ongelmaksi varsinkin värjätessä vihreällä markkerilla, sillä kudoksen autofluoresenssi on myös vihreää. Autofluoresenssin vähentäminen on haastavaa, mutta sitä voi vähentää valottamalla näytteitä UV-valolla 20 minuutin ajan ennen vasta-ainevärjäystä. [16]. Valotus himmentää autofluoresenssia pilkkomalla fluoroforin

kovalenttisiä sidoksia ja aikaansaamalla epäspesifejä reaktioita fluoroforin ja ympäröivien molekyylien välillä. [18.] Eri fluoroforit kestävät eri määrän kiihotussyklejä ennen kuin ne lakkaavat fluoresoimasta kokonaan.

Esikäsittelyn ja pesun jälkeen sitoutetaan primaariset vasta-aineet, jotka sitoutuvat suoraan kudokselle omiin spesifisiin epitooppeihinsa. Seuraavassa vaiheessa käytetään primääristen vasta-aineiden leimattuja vasta-aineita. Nämä sekundaariset vasta-aineet sitoutuvat primaarisiin vasta-aineisiin. Sekundaarisia vasta-aineita voi sitoutua useampi aina yhtä primaarista vasta-ainetta kohden, jolloin saatu fluoresenssisignaali vahvistuu.

Värjäyksen jälkeen näytteet asennetaan tyypillisesti mikroskooppilaseille ja käsitellään leimojen kanssa yhteensopivalla kiinnitysaineella. Kiinnitysaine parantaa leimojen fluoresenssin kestävyyttä ehkäisemällä ei-toivottuja muutoksia fluorofooreissa niiden kiihottuessa. Lopuksi leikkeet suojataan suojalasilla. Suojalasin tarkoitus on suojata näytteitä mekaaniselta kulumiselta ja tarjota lisäsuojaa happea vastaan.

Kiinnitysaineet muodostuvat kahdesta tai kolmesta ainesosasta: pohjasta, himmenemissuojasta ja mahdollisesta plastisuutta lisäävästä ainesosasta. Pohjana kiinnitysaineelle on joko vesi, glyseroli, öljy tai jokin muovi. Pohja-aine vaikuttaa kiinnitysaineen taitekerrotimeen kaikkein eniten. Himmenemissuoja-aine suojaa näytettä hapen vaikutukselta. Kiihottuessaan fluorofori saattaa reagoida hapen kanssa, jolloin sen fluoresenssi himmenee siinä tapahtuvien muutoksien vuoksi. Jotkin himmenemissuoja-aineet itsessään himmentävät leimoja.

Plastisuutta lisäävä ainesosa vaikuttaa kiinnitysaineen kovettumiseen. Toiset kiinnitysaineet kovettuvat koviksi, jolloin niiden taitekerroin muuttuu koko kovettumisajan. Kovettuminen voi viedä useamman vuorokauden. Toiset kiinnitysaineet jäävät pehmeiksi, jolloin näytteet ovat lähes välittömästi kuvannettavissa. Kovettumattomia kiinnitysaineita käytettäessä suojalasi tulee sinetöidä lakalla tai jollain muulla vastaavalla aineella, ettei kiinnitysaine pääse vuotamaan ulos tai kuivumaan. Tästä ei tarvitse välittää käytettäessä kovettuvia kiinnitysaineita. [19, s. 306.]

## 2.6 Fluoresenssikuvantaminen

Fluoresenssikuvantaminen perustuu eri aallonpituudella fluoresoivien proteiinien tunnistamiseen. Fluoresenssia voi tapahtua, kun fotonin energia siirtyy atomille. Tämä siirtää atomin valenssielektronin korkeampaan energiatilaan. Tämä väliaikainen tila kuitenkin purkautuu, valenssielektroni palaa alempaan energiatilaansa ja ylimääräinen energia poistuu säteilynä. Emittoituvalla fotonilla on vähemmän energiaa kuin on absorboitu, ja siksi sillä on suurempi aallonpituus. Energian erotus kuluu kineettiseen molekyylien kiihdyttämiseen. Tätä absorboituvan ja emittoituvan valon aallonpituuden erotusta sanotaan Stokesin siirroksi.

Fluoresoivaa proteiinia kiihdytetään sen spesifisellä aallonpituudella ja takaisin emittoituva valo voidaan havaita taustaa kirkkaampana. Proteiinien kiihdyttämiseen tarvittava valovoima on tyypillisesti sadoista tuhansista miljoonaan kertaa suurempi kuin niiden emittoima valo. Toimivassa fluoresenssimikroskoopissa vain emittoitu valo osuu detektorille tai okulaariin. [20.] Fluoresenssikuvantamisella voidaan saavuttaa hyvä melun ja signaalin suhde, jolloin molekyylit pieninäkin konsentraatioina voidaan erottaa toisistaan.

Zeiss Axioimager on epifluoresenssimikroskooppi, joka käyttää patentoitua IC<sup>2</sup>S-valokeilaa. Lyhenne tulee sanoista Infinity Contrast & Color Corrected System, joka on Zeissin patentoima pitkälle kehitetty valotussysteemi. Mikroskoopissa valon aallonpituutta voidaan vaihdella 6:n eri suotimen avulla. Tämä tarkoittaa, että periaatteessa 6 erilaista leimaa voitaisiin kuvantaa samanaikaisesti. Käytännössä leimojen aallonpituudet ovat kuitenkin niin lähellä toisiaan, että ne vuotaisivat valoa toistensa aallonpituuksille ja niiden erottelu olisi vaikeaa tai mahdotonta. Käytännössä tällä hetkellä voidaan kuvantaa korkeintaan 3 erilaista leimaa samaan aikaan. Kuvassa 6 on esitetty Axioimager.



Kuva 6. Zeiss Axioimager -epifluoresenssimikroskooppi. [21]

Mikroskooppi on automatisoitu, ja sen toimintoja voidaan ohjata tietokoneella. Axioimager osaa tarkentaa automaattisesti ja säätää itse eri filttäreille eri valotusajat. Tämä mahdollistaa nopean sarjakuvaamisen usealla eri filttillä. Axioimager voidaankin ohjelmoida ottamaan mosaiikkikuvia, joissa se ottaa kuvia valitulta alueelta valituilla filttäreillä. Kuvien reunat ovat osittain päällekkäin ja algoritmi rakentaa kuvista yhden ison kuvan.

Objektiiveina mikroskoopissa on 5-, 10-, 20-, 40-, 60- ja 100-kertaiset suurennokset. Ensimmäiset kolme ovat ilmaobjektiiveja ja toimivat ilman väliaineita. Suuremman suurennoksen 40-, 60- ja 100-kertaiset objektiivit vaativat objektiivöljyä näytteen ja objektiivin väliin. Öljyn optinen tiheys on mahdollisimman lähellä lasin optista tiheyttä, jolloin valo ei taitu. Tällöin kuva on tarkempi.

Axioimageriin voidaan liittää lisälaitteena Apotome. Normaalisti kuvannettaessa paksuja leikkeitä eri tasoissa olevat solurakenteet näkyvät erilaisessa tarkennuksessa. Tarkennustasoa kauempana ja lähempänä olevat solurakenteet näkyvät epätarkkoina. Apotomen perusideana on käyttää ruudukkoa valoaukossa, jonka läpi näyte valaistaan. Ruudukko liikkuu ja sen heittävä varjo vaihtaa paikkaa. Mikroskooppi ottaa kolme raakaku-

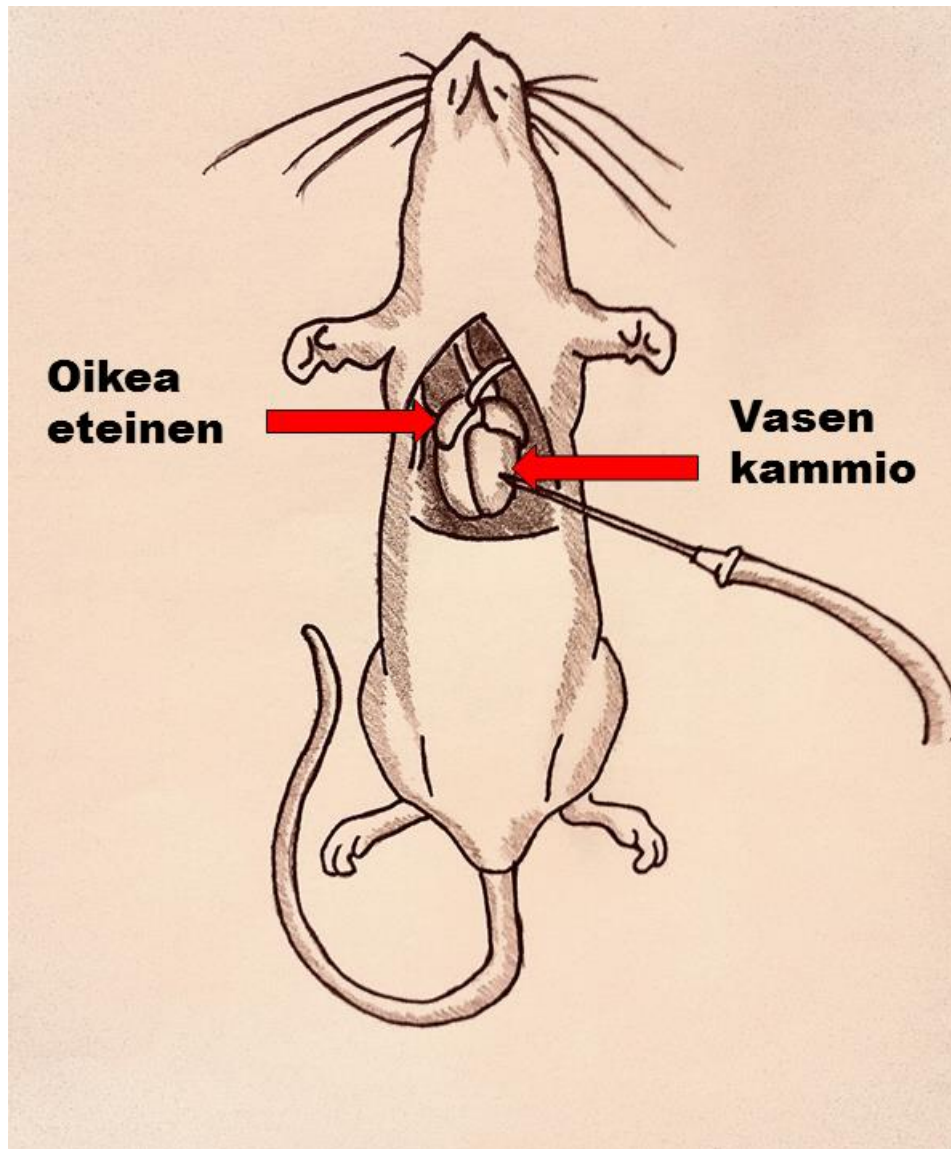
vaa ruudukon varjon ollessa eri kohdissa. Nämä kolme kuvaa yhdistetään matemaattisesti ja syntyy yksi kirkas kuva, jossa epätarkkaa taustakohinaa esiintyy vähemmän. Apotome on hyödyllinen silloin kun kuvannetaan yli 10 µm paksuja leikkeitä. [22.]

Apotomen avulla voidaan myös kuvantaa z-pino-kuvia. Z-pino viittaa syvyyssulottuvuudessa tapahtuvaan liikkeeseen ja pinolla viitataan siihen, että jokaisesta tasosta otetaan kuva ja kuvat asetetaan päällekkäin. Tällöin saadaan yhdestä kohdasta korkeus- ja leveysasemassa kuva, mutta koko syvyyden matkalta. Z-pinon avulla voidaan tarkastella eri tasoilla sijaitsevia solurakenteita tarkkoina kuvina.

### **3 Työn suoritus**

#### **3.1 Näytteiden keräys**

Aivot kerättiin hiiriltä terminaalianestesiassa. Hiirille annettiin 0,1 ml pentobarbitaalia (60 mg/ml) injektoimalla vatsaonteloon. Varmistuttua kirurgisesta anestesiasta hiirille suoritettiin perfuusio sydämen kautta. Eläimen rinta avattiin ja vasempaan kammioon asennettiin neula, sekä oikeaan eteiseen tehtiin viilto. Kuvassa 7 on merkitty sekä oikean eteisen että vasemman kammion sijainti hiiren sydämessä. Neulan kautta eläimen verenkiertoon infusoiitiin letkupumpulla kylmää PBS-liuosta (NaCl 0,9 %,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,1 % ja  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0,05 % veteen liuotettuna), joka nopeasti saavutti kaikki kudokset verenkierron välityksellä. Samaan aikaan veri työnäyti pois kudoksista oikeaan eteiseen tehdyn aukon kautta. Tämän jälkeen eläimeen pumpattiin kylmää 4 % PFA-liuosta (paraformaldehydi 4 %, PBS 10 %, vesi 86 %), kunnes kudokset oli kyllästetty. PFA-liuos oli valmistettu juuri ennen perfuusiota, jotta se olisi tuoretta.

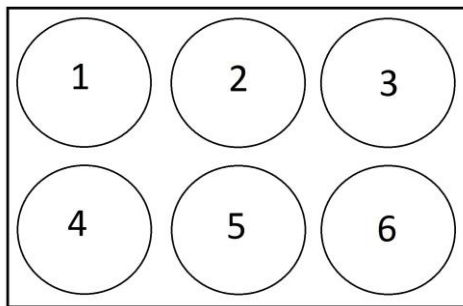


Kuva 7. Hiiren perfuusio. Vasempaan kammioon on asennettu neula, johon pumpataan letkulla PBS-liuosta. Oikeaan eteiseen on tehty viilto.

Kun hiiri oli kyllästetty PFA-liuoksella, sen pää leikattiin irti korvien takaa ja kallo avattiin. Iho poistettiin kallolta, sitten saksilla tehtiin viilto silmien väliin. Kallon takaosaan molemmille sivuille tehtiin aloitusviillot saksilla. Kallon yläosa irroitettiin pinseteillä. Paljastuneet aivot irrotettiin varovasti pinseteillä hermoista ja ne asetettiin PFA-liuokseen muoviputkeen, jossa ne olivat yön yli. Seuraavana päivänä aivot siirrettiin 30-prosenttiseen glukosiliuokseen, jossa ne olivat, kunnes laskeutuivat pohjalle. Tähän meni noin kaksi päivää. Aivojen laskeuduttua pohjalle oli niiden osmoottinen paine sama kuin ympäröivässä sokeriliuoksessa ja ne voitiin jäädyttää.

Aivot pikajäädystettiin jäähdytetyssä metyylibutaanissa, jonka jälkeen ne siirrettiin kylmennetyille metallilevyille jäätymään loppuun asti. Metallilevy ja metyylibutaani oli jäähdytetty hiilidioksidijään avulla, ja koko jäädystysoperaatio voitiin tehdä huoneenlämmössä.

Kun aivot oli jäädystetty, niistä tehtiin leikkeitä. Aivoleikkeistä leikattiin 40 mikrometrin paksuisia kryostaatissa (Leica CM3050, Leica Microsystems, Nußloch, Saksa). Toimintapään lämpötila oli säädetty -16 °C:seen ja vaipan lämpötilaksi määriteltiin -20 °C. Leikkeet kerättiin talteen pehmeäkarvasilla taitelijapensseleillä ja ne tallennettiin -20 °C:seen pakkasnesteeseen (PBS 50 %, etyleeni glykoli 30 %, glyseroli 20 %) 6-kuoppalevyihin. Yhdet aivot leikattiin 6-kuoppalevyyn siten, että joka seitsemäs leike aloitti kierroksen alusta, kuvan 8 mukaisesti. Jokaisista aivoista saatiin 6 lähes rinnakkaista näytettä, joissa jokaisessa oli 240 mikrometrin välein leikkeitä.



Kuva 8. Kuusikuoppainen kuoppalevy ja numeroitu esitystapa näytteiden tallentamisesta.

### 3.2 Immunohistokemiallinen värjäys

Pakkasnesteessä olevat aivoleikkeet pestiin ensin neljästi PBS-liuoksessa. Pesu tapahtui 6-kuoppalevyllä 5 ml:n tilavuudessa. Kuoppalevy oli ravistelijassa 150 rpm:n nopeudella, 5 minuuttia per pesu. Jokaisen pesun jälkeen leikkeet siirrettiin pensselillä uuteen kuoppaan kuoppalevyllä ja puhtaaseen PBS-liuokseen. Tämän jälkeen leikkeet käsiteltiin 8 pH 0,1 M natriumsitraatilla koeputkessa. Koeputki oli lämpöblokissa 80 °C 15 minuutin ajan. Lämpökäsittelyn jälkeen leikkeiden annettiin jäähtyä huoneenlämpöön noin 10 minuutin ajan. Jäähdytymisen jälkeen ne pestiin neljästi PBS-liuoksessa kuten aikaisemmin. Tämän jälkeen leikkeet käsiteltiin estoliuoksella (naudan albumiiniseerumia 10 %, aasiseerumia 0,1 % ja Triton x-100 0,3 % laimennettuna PBS-liuokseen). Leikkeet



siirrettiin 24-kuoppalevyille yhteen kuoppaan. Leikkeet olivat tunnin 500 ml:n estoliuoksessa ravistelijalla.

Neljä näytettä käsiteltiin muuten täysin identtisesti muiden näytteiden kanssa, mutta estoliuoksen Triton x-100 -pitoisuus oli nostettu kahteen prosenttiin. Tätä kokeiltiin, koska epäiltiin, että solukalvojen huono läpäisevyys vaikutti värjäytymiseen.

Eston jälkeen suoraan estoliuokseen pipetoitiin primaariset vasta-aineet: vuohi anti-ChAT (AB144P, 1:100; Chemicon, Temecula, USA), hiiri anti-VGLUT2 (mab 5504, 1:300; Chemicon, Temecula, USA) ja jänis anti-mCherry (ab167453, 1:800; Abcam, Iso-Britannia). Liitteessä 2 on esitetty pipetoidut vasta-aineet ja laimennokset. Liuoksen annettiin inkuboitua 4 °C:ssa ravistelussa yön yli. Seuraavana päivänä leikkeet poistettiin inkubointiliuoksesta ja pestiin 4 kertaa 5 minuutin ajan PBS-liuoksessa ravistelijalla. Pesun jälkeen leikkeet siirrettiin uuteen 500 ml:n estoliuokseen, johon pipetoitiin sekundääriset vasta aineet: aasi anti-vuohi 405 (ab175664, 1:1000; Abcam, Iso-Britannia), aasi anti-hiiri 488 (A-21202, 1:1000 Invitrogen, Carlsbad, USA) 1:1000 aasi anti-jänis 594 (ab150076, 1:1000; Abcam, Iso-Britannia). Leikkeitä inkuboitui valolta suojattuna ravistelijalla kahden tunnin ajan huoneenlämmössä.

Värjäyksen aikana tehtiin myös koe, jossa käytetty vasta-aineita sisältävä estoliuos otettiin talteen ja käytettiin seuraavana päivänä uuteen värjäykseen. Koe tehtiin, jotta voitaisiin selvittää helposti, onko käytetty vasta-ainekonsentraatio liian suuri, ja mahdollisten rahallisten säästöjen takia. Primaariset vasta-aineet ovat vasta-ainevärjäyksen kalleimmat reagenssit ja niiden käyttöä kannattaa optimoida

Inkuboinnin jälkeen leikkeet pestiin samalla pesuprotokollalla, mutta valolta suojattuna. Pesun jälkeen leikkeet siirrettiin petrimaljaan PBS-liuokseen kellumaan. Petrimaljalta ne siirrettiin mikrokooppilasille pehmeällä harjalla. Lasilta pyyhittiin ylimääräiset PBS-liuokset pois ja suojalasi kiinnitettiin kiinnitysaineella.

Myöhemmin pesuprotokollaa muutettiin, jotta värjäyksestä saataisiin vähemmän työläs ja useampia aivoja voitaisiin värjätä yhtä aikaa. Ensimmäiseksi korvattiin kaikki neljä viiden minuutin pesua yhdellä 20 minuutin pesulla dekanterissa 50 ml:n PBS-liuoksessa. Tämän jälkeen kokeiltiin jakaa pesu kahteen 10 minuutin pesuun 50 ml:n tilavuudessa

samassa dekantterissa. Ensimmäisen pesun jälkeen leikkeiden annettiin laskeutua pohjalle ja suurin osa PBS-liuoksesta imettiin pois dekantterilasista ja korvattiin puhtaalla. Pohjalle jätettiin vanhaa PBS-liuosta sen verran, että leikkeet eivät imeytyneet mukaan.

Kun leikkeet oli kiinnitetty mikroskooppilaseille, ne suojattiin kiinnitysaineella. Ensimmäisiin näytteisiin käytettiin Fluorsave™-kiinnitysainetta, mutta myöhemmin vaihdettiin Prolong Diamond™ antifade -kiinnitysaineeseen. Prolong Diamondin annettiin kovettua 24 tunnin ajan, jotta se saavuttaisi oikean taitekertoimen. Kovettamisen annettiin tapahtua huoneenlämmössä ja valolta suojattuna. Fluorsave reagenssin ei tarvinnut antaa kovettua ja sillä käsitellyt leikkeet säilytettiin kylmässä.

### 3.3 Mikroskopointi

Näytteet kuvannettiin Zeiss Axioimager -fluoresenssimikroskoopilla. Näytteitä viritettiin vasta-aineiden leimojen valonpituuksilla: 405 nm, 488 nm ja 594 nm. Nämä valot näkyvät sinisenä, vihreänä ja punaisena. Kuvantaminen tehtiin pimeässä huoneessa. Leikkeistä otettiin kuvia Zen Pro-ohjelmalla. Kuvista tutkittiin, oliko leimautuminen onnistunut ja olivatko DREADD-injektiot osuneet oikeille aivoalueille ja toivottuihin soluihin.

Näytteistä otettiin mosaiikkikuvat ja niiden perusteella arvioitiin injektoiden osumista oikealla aivoalueella. Näytteistä otettiin myös 20-kertaisella suurennuksella lähikuvia, joissa tarkasteltiin yksittäisten solujen erottumista. PPT-aivoalue tunnistettiin kolinergisten solujen levinneisyyden mukaan. DREADD-reseptorien osumista glutamaattisoluihin arvioitiin mCherry- ja VGLUT2-leimojen päällekkäisyyden mukaan.

## 4 Tulokset ja niiden tarkastelu

Näytteet ja niille tehdyt erilaiset käsittelyt taulukoitiin taulukkoon 1. Taulukosta voitiin etsiä yhteisiä tekijöitä värjäyksen onnistumiselle. Taulukosta havaitaan, että joko ChAT- tai VGLUT2-leimautuminen onnistui, mutta yhtä aikaa ne eivät toimineet. mCherry-värjäys onnistui paria poikkeusta lukuun ottamatta joka kerta. Näytteitä oli käytettävissä 21.

4 hiirtä oli menehtynyt aiemmissa käyttäytymiskokeissa, joten niiden aivoja ei oltu saatu talteen.

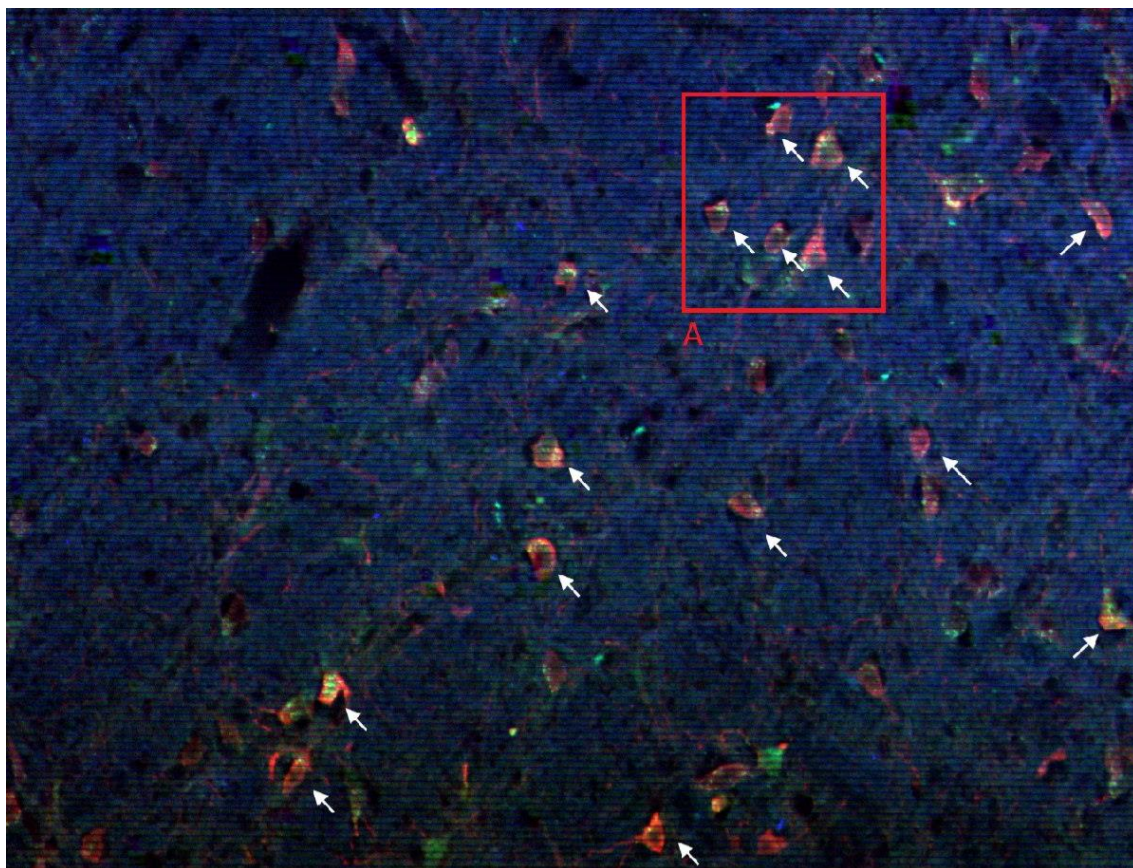
Taulukko 1. Näytteet, niille tehty käsittelyt ja niistä tehtyjä huomioita. Taulukossa ensimmäisellä sarakkeella on näytteen numero, toisessa sarakkeessa ilmoitetaan, ovatko DREADD-injektiot osuneet PPT-alueille. Ohi tarkoittaa injektoiden menneen ohi, osua tarkoittaa injektoiden osuneen. Osui/ohi tarkoittaa toisen injektion osuneen ja toisen menneen ohi. Kolmannessa sarakkeessa ilmoitetaan, pystyttiinkö näytteestä kuvantamaan samanaikaista mCherry- ja VGLUT2-leimautumista. X tarkoittaa, että pystyttiin, tyhjä tarkoittaa, ettei pystytty. Neljännessä sarakkeessa ilmoitetaan sama mCherry- ja ChAT-leimautumisen kannalta. Viides sarake erittelee käytetyn kiinnitysaineen. Kuudes sarake kertoo, millainen pesu näytteelle tehtiin. Kuoppalevy tarkoittaa pesun olleen 4-vaiheinen 6-kuoppalevyllä suoritettu. 1/- ja 2/dekanteri tarkoittaa yksivaiheista tai kaksivaiheista dekanterissa suoritettua pesua. Sarake 7 ilmoittaa estoliuksen Triton x-100 -pitoisuuden. Sarakkeessa 8 on muita huomioita näytteistä.

1	2	3	4	5	6	7	8
Hiiri ID	Injektio	mcherry w/ vglut2	mcherry w/ chat	Kiinnitysaine	Pesu	Triton	muuta
1	osui	ei tehty	x	diamond antifade	kuoppalevy	0,3 %	
2	ohi	ei tehty	x	diamond antifade	kuoppalevy	0,3 %	
3	osui/ohi	x		fluorsave	kuoppalevy	0,3 %	
4	osui	x		diamond antifade	1/dekanteri	0,3 %	
5	osui/ohi	x		diamond antifade	kuoppalevy	0,3 %	
6	osui			diamond antifade	2/dekanteri	0,3 %	
7	osui		x	diamond antifade	1 ja 2/dekanteri	0,3 %	2 eri värjäystä
8							Hiiri menehtynyt kokeissa
9	osui		x	diamond antifade	2/dekanteri	2,0 %	
10	ei voi sanoa			diamond antifade	1/dencanter	0,3 %	Kudos huono
11	osui		x	diamond antifade	1/dekanteri	0,3 %	
12							Hiiri menehtynyt kokeissa
13	osui		x	diamond antifade	2/dekanteri	2,0 %	
14	ei voi sanoa			diamond antifade	1/dekanteri	0,3 %	Ei PPT:tä värjätty
15	osui	x		diamond antifade	kuoppalevy	0,3 %	Epäspesifiä värjäytymistä
16	osui		x	diamond antifade	kuoppalevy	0,3 %	Ei tehty vGlut2-värjäystä
17	osui			fluorsave	kuoppalevy	0,3 %	
18	ei voi sanoa	x		diamond antifade	1/dekanteri	0,3 %	
19	osui		x	diamond antifade	1/dekanteri	0,3 %	
20							Hiiri menehtynyt kokeissa
21							Hiiri menehtynyt kokeissa
22	osui	x	x	diamond antifade	kuoppalevy	0,3 %	Epäspesifiä värjäytymistä
23	osui	x	x	diamond antifade	2/dekanteri	2,0 %	Epäspesifiä värjäytymistä
24	ei voi sanoa	x		diamond antifade	1/dekanteri	0,3 %	Ei PPT-aluetta värjätty
25	ei voi sanoa			diamond antifade	2/dekanteri	2,0 %	Värjäys ei toiminut

#### 4.1 Neuronien värjäytyminen

Glutamaattineuronit ja DREADD-reseptorit saatiin leimattua samanaikaisesti osassa näytteistä ja niiden voitiin havaita sijaitsevan samoissa soluissa, kuten kuvasta 9 voidaan huomata. Tarkemmassa lähikuvassa punaisella ympyröidystä alueesta A, voidaan ha-

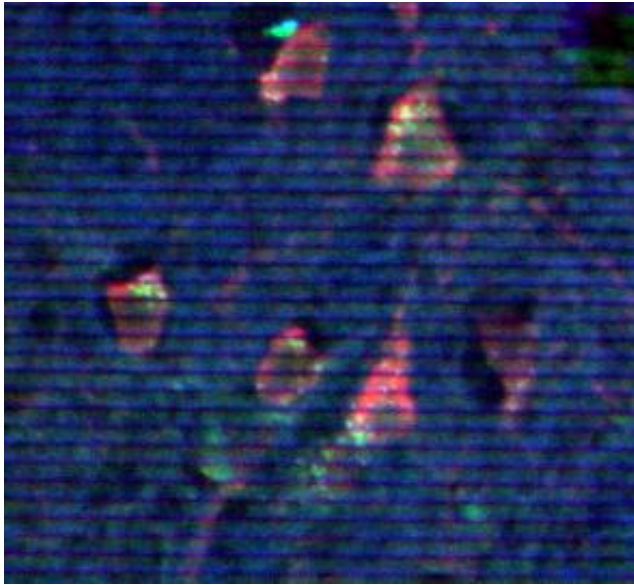
vaita tarkemmin VGLUT2-leiman, joka merkitsee glutamatergiset solut, ja mCherry-leiman, joka leimaa DREADD-reseptorit, päällekkäisyys. Kuvaan on eroteltu valkoisilla nuolilla solut, joissa voidaan selvästi havaita sekä VGLUT2- että mCherry-leima. ChAT-leimautuminen, eli kolinergisten solujen leima, ei onnistunut näytteessä. Kuvassa on näyte numero 3.



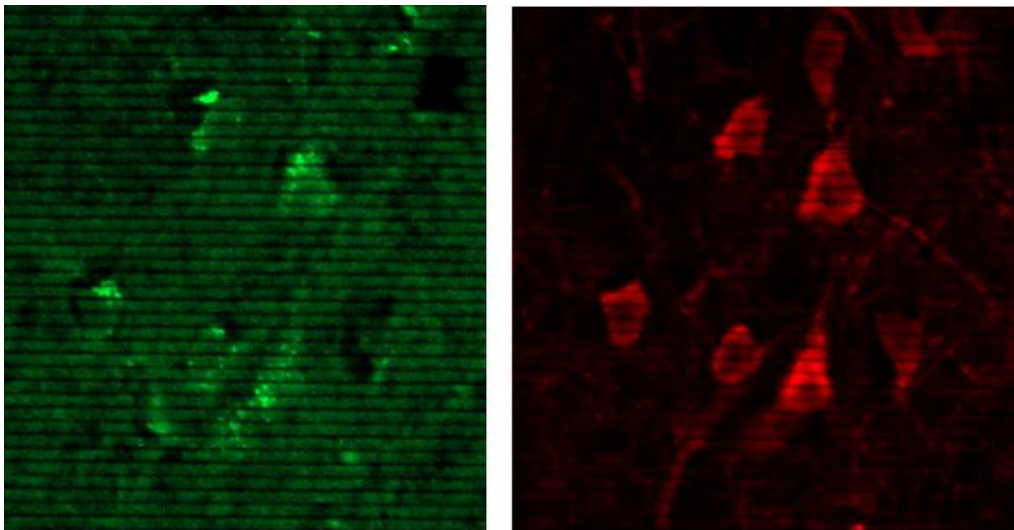
Kuva 9. Apotome z-pino kuva ChAT-, VGLUT2- ja mCherry-vasta-ainevärjäyksestä hiiren aivo-kudosleikkeelle näytteestä numero 3. Kuva otettu 10-kertaisella suurennoksella. Punaisella erottuvissa soluissa on mCherry-reseptoreita, eli niissä ilmentyy DREADD-reseptoreita. VGLUT2-leima erottuu vihreänä ja merkkää glutamatergiset solut. Nuolet osoittavat soluja joissa voidaan selvästi sanoa olevan VGLUT2- ja mCherry-reseptoreita.

Kuvassa 10 on esitetty punaisella rajattu alue A tarkemmassa lähikuvassa. Kuvassa 10 on eroteltu punainen ja vihreä kanava erikseen ja voidaan tarkastella yksittäisten leimojen erottumista. Kuvasta 11 voidaan havaita punaisella kanavalla, kuinka DREADD-reseptoreilla injektoiduista soluista lähtevät aksonit erottuvat. Tulokset olivat osin odotetunlaiset, osin eivät. Kuvasta voi havaita DREADD-reseptorien ilmentyvät glutamatergisissä soluissa, joka oli ollut tavoitteena aikaisemmin tehdyissä eläinkokeissa. Kuvasta huomataan myös, että VGLUT2- ja mCherry-vasta-ainevärjäys toimii samanaikaisesti.

ChAT-leimautuminen, eli kolinergisten solujen värjäys, ei onnistunut, mikä ei ollut odotettua.



Kuva 10. Apotomekuva A-alueesta punaisella ja vihreällä kanavalla. Kuva on otettu 10-kertaisella suurennoksella

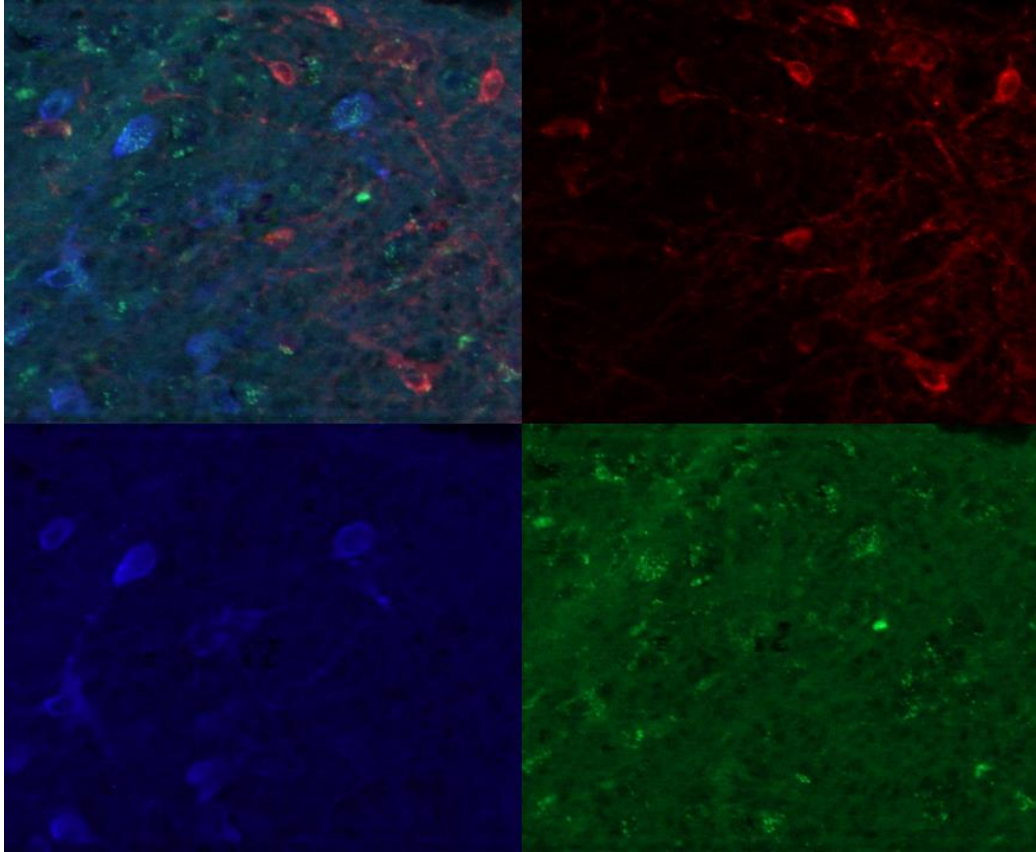


Kuva 11. Apotomekuva A-alueesta vihreän, punaisen ja sinisen kanavan yhteiskuvana. Kuva on otettu 10-kertaisella suurennoksella

Samanaikainen ChAT- ja mCherry-värjäys oli onnistunutta osassa näytteistä. Kuvassa 12 erottuu sinisellä leimautuneet kolinergiset solut, jotka sisältävät ChAT-leiman ja punaiset DREADD-reseptoreja sisältävät solut. Kolinergisissä soluissa ei havaittu DREADD-reseptoreita, kuten oli toivottukin. Tausta autofluoresoi vihreällä, ja glutamaat-



ti solujen VGLUT2-värjäys ei ole onnistunut kuvassa 12. VGLUT2-leimoja näyttäisi sijaitsevan kolinergisissä neuroneissa. Tämä on mahdollista, sillä osa kolinergisistä neuroneista sisältää myös glutamaattireseptoreita, jotta ne voivat vastaanottaa glutamaattisolujen viestejä.



Kuva 12. Näyte 17:stä kuvannettuna 10-kertaisella suurennoksella. Näyte on värjätty mCherry-, ChAT- ja VGLUT2-vasta-aineilla. Näytteessä on onnistunut mCherry- ja ChAT-vasta-ainevärjäys, eli DREADD-reseptorien ja kolinergisten solujen värjäys. VGLUT2-vasta-aine ei ole sitoutunut glutamaattisoluihin. Sinisellä näkyvät ChAT-, punaisella mCherry- ja vihreällä VGLUT2-markkerit

#### Johtopäätökset värjäytymisestä

VGLUT2- ja ChAT-värjäys ei toiminut samanaikaisesti, paitsi epäspesifisenä värjäytymisenä. Taulukosta 1 voidaan havaita, että kumpikin leimautuminen onnistui, mutta ei koskaan samanaikaisesti siten, että leimautuminen olisi ollut spesifistä. Tämä viittaisi siihen,

että on jokin yhteinen tekijä, joka vaikuttaa kumpaankin leimaan, mutta eri tavalla. Tämän yhteisen tekijän mahdollistaessa toisen onnistumisen se samalla estää toista.

VGLUT2-värjäyksen onnistuminen osoittautui hankalammaksi kuin ChAT- tai DREADD-reseptorien värjäys. DREADD-reseptoreiden värjääminen onnistui lähes joka kerta, olosuhteista välittämättä. ChAT-leima onnistuessaan erottui aina selkeästi ja hyvin. VGLUT2-leimat onnistuessaan eivät erottuneet aina selvästi. Osasyynä tähän voi olla kudoksen taustafluoresenssi, joka on vihreää. VGLUT2-leimat oli leimattu myös vihreällä fluoresenssilla, jolloin niiden signaali-melu suhde ei ollut niin hyvä. Voikin olla, että joissain tapauksissa VGLUT2-leimat hukkuivat taustafluoresenssin alle.

Taustafluoresenssia olisi mahdollista vähentää säteilyttämällä kudosteille UV-valolla ennen niiden värjäämistä. Toinen vaihtoehto olisi ostaa kaupallista taustafluoresenssia vähentävää reagenssia. Kolmas vaihtoehto olisi värjätä VGLUT2-markkeri jollain toisella fluoroforilla, esimerkiksi infrapunalla. Tällöin tarvittaisiin uudenlaisia suotimia käytössä olevaan mikroskooppiin.

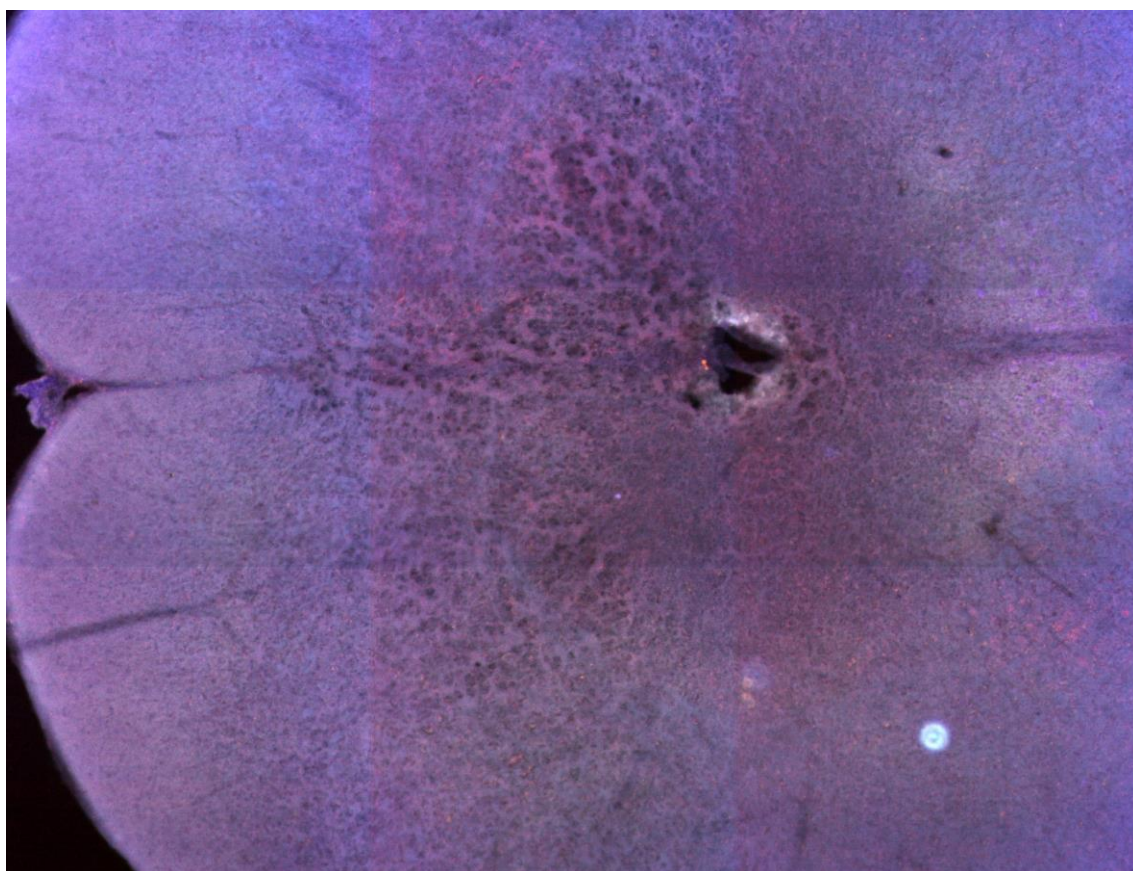
#### 4.2 Menetelmän optimoinnin tulokset

Fluorsave kiinnitysaine osoittautui yhteensopimattomaksi sinisellä leimattujen ChAT-vasta-aineiden kanssa. Sininen leima hiipui ennen kuin sitä pystyttiin kuvantamaan. Sitä käytettäessä vihreällä fluoresoivat VGLUT2-leimat olivat kuitenkin parhaiten erottuvia (kuva 8). Prolong Diamond Antifadea käytettäessä sininen fluoresenssi ei himmentynyt, vaan sitä pystyttiin kuvantamaan samanlailla kuin muitakin leimoja. Kuvassa 11 näkyy ChAT-leimautuminen Prolong Diamondia käytettäessä. Kun Fluorsave reagenssi vaihdettiin Prolong Diamond Antifadeen, saatiin sininen leima kestämään kuvantamista ja mahdollista säilytystä. Päästiin myös eroon suojalasien lakkaamisesta ja näytteitä voitiin tarvittaessa säilyttää lämpimässä.

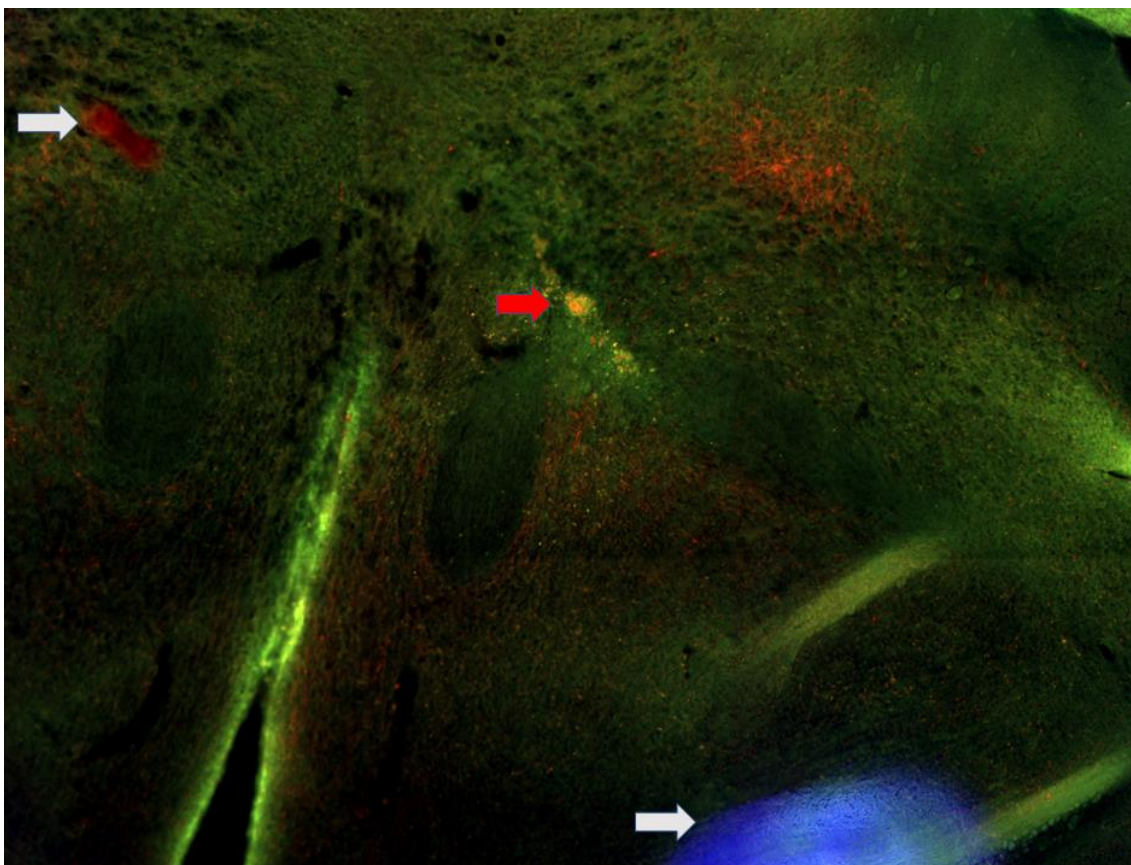
Yksivaiheista dekantteripesua käytettäessä havaittiin osan leikkeistä peseytyneen vajavaisesti. Kudosta tarkasteltaessa mikroskoopilla saatettiin havaita sen pinnan rakenteen eroavan merkittävästi peseytyneistä leikkeistä. Tämä voidaan havaita kuvista 13 ja 14. Näillä leikkeillä ei myöskään usein tapahtunut minkäänlaista leimaantumista. Mikäli tapahtui, se oli epäspesifistä, kuten voidaan huomata kuvasta 14. Leikkeiden olisi toivottu



peseytyvän paremmin, jolloin spesifi leimautuminen olisi ollut mahdollista. Pinnalle jääneet kemikaalit ovat vaikuttaneet sitoutumiseen ja joko estäneet sen kokonaan tai tehneet siitä epäspesifiä. Dekantterissa tehty kaksivaiheinen pesu ei eronnut tuloksiltaan neljässä vaiheessa kuoppalevyllä suoritettuun pesuun. Nelivaiheinen perinteinen pesutapa voidaankin siis korvata nopeammalla ja helpommalla kaksivaiheiselle pesulla dekantterissa.



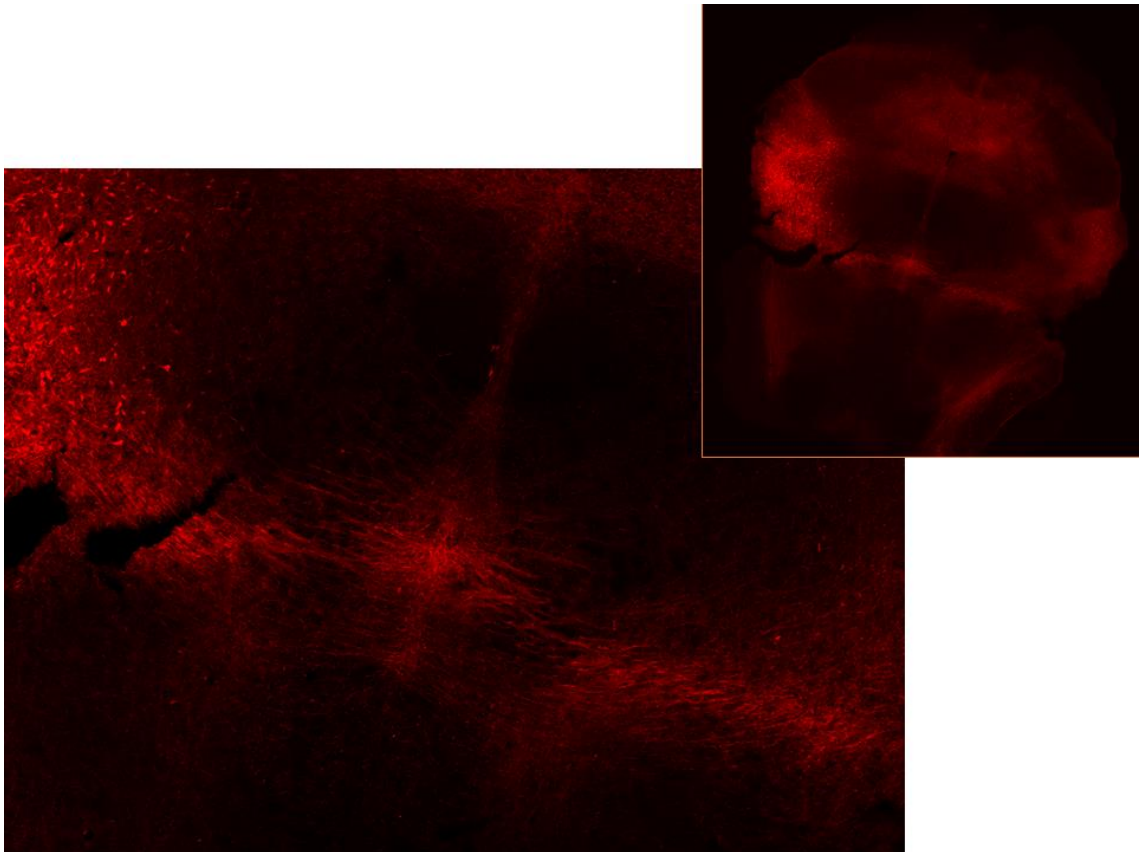
Kuva 13. Peseytymätön leike. Kuvassa on näyte 18, joka on leimattu ChAT-, mCherry-, ja VGLUT2-leimoilla. Kuvannettu 5-kertaisella suurennoksella. Leimaantumista ei ole havaittavissa, ja kudoksen näyttää erilaiselta kuin puhtaassa leikkeessä.



Kuva 14. Peseytymätön leike. Kuvassa on näyte 22 ja se on kuvannettu 10-kertaisella suurennoksella. Punaisella nuolella on merkattu epäspesifistä leimaantumista. Valkoisilla nuolilla on merkattu muuta roskaa leikkeellä.

#### Estoliuoksen koostumus

Triton x-100 -pitoisuuden kasvattaminen kahteen prosenttiin ei parantanut VGLUT2-leimautumista. Mutta kolinergiset solut ja DREADD-reseptorit erottuivat kirkkaammin kuin pienemmällä Triton-pitoisuudella. Myöskin DREADD-reseptoreita sisältävät aksonit erottuivat hämmästyttävän hyvin. Kuvassa 15 erottuu hyvin DREADD-reseptoreita sisältäviä aksoneita. Erona muihin leikkeisiin oli aksoneiden erottuminen selvästi läpi aivojen.



Kuva 15. DREADD-reseptoreita sisältäviä aksoneita. Kuvassa näyte 16. Yläkulman kuva on mosaiikkikuva otettuna 5-kertaisella objektiivilla. Suurempi kuva alhaalla on otettu 10-kertaisella suurennoksella. Värjäys tehtiin VGLUT2-, mCherry-, ja ChAT-vasta-aineilla, mutta vain mCherry-leimaantuminen onnistui. Aksonit erottuvat harvinaisen hyvin punaisina juovina.

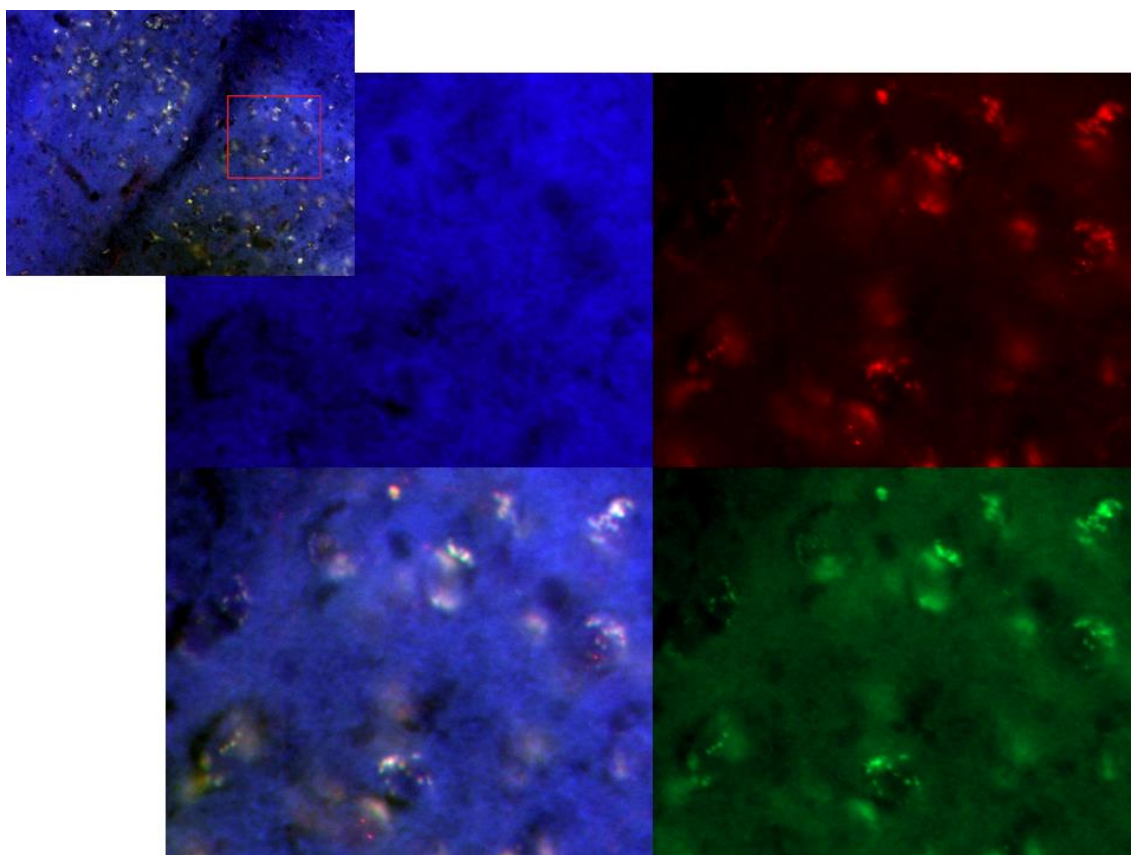
Käytetty vasta-aineliuos pystyttiin käyttämään kerran uudelleen, mikäli sitä käytettiin ensimmäisessä värjäyksessä kaksinkertainen määrä normaaliin verrattuna. Kun sitä käytettiin vain normaali määrä, niin toisella värjäyskerralla onnistui vain mCherry-värjäys. Vasta-aineliuosta ei siis kannata yrittää käyttää useampaan otteeseen.

## 5 Tulosten luotettavuus

Tuloksia tulkittiin kuvista silmämääräisesti. Solut tunnistettiin niiden morfologian perusteella. Epäspesifistä leimaantumista esiintyi, mutta se pystyttiin havaitsemaan morfologian tuntemuksen avulla. Kuvassa 16 on epäspesifiä leimaantumista, jota ei tule sekoittaa soluihin. Sen erottaa spesifisestä siitä, että leimat eivät muistuta muodoltaan soluja. mCherry-leimalla pitäisi myös näkyä aksoneita, mutta niitä ei ole erotettavissa. Taustalla



näky myös utuista fluoresenssia, joka näyttää kaikilla kanavilla samalta. Tämäkin viittaa epäspesifiin leimautumiseen.



Kuva 16. Yleiskuva ja tarkempi lähikuva punaisella merkitystä alueesta. Kuva on näytteestä 22. Vasemmassa yläkulmassa yleiskuva, joka on otettu mosaiikkikuvana 10-kertaisella suurennoksella. Tarkemmat lähikuvat on myös otettu 10-kertaisella objektiivilla. Leike on värjätty mCherry-, VGLUT2-, ja ChAT-vasta-aineilla. Kuvassa on esitetty sinisellä, vihreällä ja punaisella kanavalla kuvatut kuvat ja näistä muodostettu yhteiskuva. Kuvasta voidaan huomata, etteivät leimautuneet alueet muistuta ulkonäöltään soluja.

DREADD-injektoiden onnistumista tarkasteltaessa ChAT-leimautuneita kolinergisiä soluja voitiin käyttää kontrolleina. Mikäli mCherry-leimautumista esiintyi samoissa soluissa kuin ChAT-leimaa, tiedettiin virusvektorien kulkeutuneen kolinergisiin soluihin ja saaneen ne ilmentämään DREADD-reseptoreita tai sitten tapahtuneen epäspesifiä leimautumista. Morfologian tuntemuksen avulla ja vertailemalla värjäytyneitä soluja keskenään voitiin erotella toisistaan epäspesifinen leimautuminen ja oikeasti leimautuneet solut. Toisaalta taas VGLUT2-markkeri saattaa ilmentyä myös joissain kolinergisissä soluissa.

## 6 Päätelmät

Työn tavoitteena ollut immunohistokemiallista kolinergisten neuronien, glutamatergisten neuronien ja DREADD-reseptorien värjäysmenetelmää ei onnistuttu kehittämään halutunlaiseksi. Kolinergisiä soluja leimaavien ChAT-leimojen ja glutamatergisiä soluja leimaavien VGLUT2-leimojen yhteensopimattomuus tuli yllätyksenä, eikä insinööriyölle asetettujen aika- ja budjettirajoitteiden sisällä onnistuttu ratkaisemaan tätä ongelmaa. Työstä saatiin hyvää tietoa kolmoisvärjäyksen haasteista ja mahdollisista toimintavoista kyseisen ongelman suhteen.

Vaikkei alkuperäisenä tavoitteena ollut kolmoisvärjäys onnistunut, voidaan työtä silti käyttää haluttuun tarkoitukseen, joka oli varmistuminen DREADD-reseptorien sijainnista glutamaattisoluissa pedunkulopontisen tumakkeen alueella. Näytteistä pystyttiin erottamaan DREADD-reseptorien sijaitsevan glutamatergisissä neuroneissa, joka oli tutkimusryhmän päämielenkiinnon aihe. Jatkossa voidaan suorittaa kaksi samanaikaista värjäystä rinnakkaisnäytteistä, joista toisessa käytetään ChAT- ja mCherry-leimaa ja toisessa VGLUT2- ja mCherry-leimaa. Värjäyksiä tarkastellessa voidaan ChAT/mCherry-värjäyksellä varmistua oikeasta aivoalueesta ja siitä, että DREADD-reseptorit eivät ole kolinergisissä soluissa. VGLUT2/mCherry-värjäyksestä voidaan varmistua DREADD-reseptorien sijainnista glutamaattisoluissa. Värjäysprotokollaa voitaneen käyttää suoraan tehdyn kaltaisena, jättämällä vain pois kolmas vasta-aine.

Työn aikana onnistuttiin myös tehostamaan perinteisesti käytettyä näytteiden pesumenettelyä aikaa ja vaivaa säästäväksi. Tehostetun pesun avulla on jatkossa mahdollista värjätä kerralla suurempia määriä leikkeitä. Tämä helpottaa tilastollisen merkittävyyden saavuttamista, kun voidaan käsitellä kerralla suurempi määrä rinnakkaisnäytteitä.

Mahdollisia jatkotutkimuksia voitaisiin tehdä kolmoisvärjäyksestä. Kolmoisvärjäystä voisi kehittää pidemmälle. Työn aikana mahdolliseksi ongelmakohdiksi värjäyksessä arvioitiin käytetty kestäväoimismenetelmä, puutteellinen antigeenien palautus, yhteen sopimattomat vasta-aineet ja liian vahva taustafluoresenssi.

Nykyisen kestäväoimismenetelmän tilalle voidaan kokeilla muita menetelmiä. Elohopeadikloridi on kemikaali, jota voidaan käyttää PFA-liuoksen tilalla säilömään kudoksia. Sen etuina ovat hyvä solujen läpäisy, joka johtaa kirkkaampiin leimoihin värjäyksessä, ja solujen morfologian parempi säilyminen. Myös etanolia, metanolia tai asetonia voidaan

käyttää kestäväimiseen. Niiden etuna on solukalvon läpäisykyvyn lisääminen, joka saattaisi auttaa VGLUT2-värjäyksessä. Yksi perinteinen tapa säilöä näytteitä on upottaa ne parafiiniin, jolloin niitä ei tarvitse pakastaa.

Antigeenien palautukseen voidaan myös kokeilla erilaisia menetelmiä. Voidaan lisätä nykyisen sitraattipuskurissa lämmityksen jälkeinen vetyperoksidikäsittely. Tai sitraattipuskurin pH:ta voidaan kokeilla muuttaa alkalisemmaksi, neutraaliksi tai happamaksi. pH:n vaikutus antigeenien palautukseen voi olla merkittävä. pH 8 on optimoitu ChAT-vasta-aineelle, joten sen muuttaminen voi vaikuttaa taas ChAT-leimaantumisen onnistumiseen. Monesti palautukseen käytetään myös höyrytystä tai mikroaaltouunikäsittelyä, mutta pakastetut leikkeet kestävät huonosti näin kovia käsittelyjä. Mikäli leikkeet säilytetään parafiinissä, voisi niille kokeilla näitä palautusmenetelmiä.

Yksi mahdollisuus parantaa leimaantumista olisi kokeilla eri vasta-aineita. Vasta-aineet oli valittu siten, että niiden ei pitäisi reagoida ristiin, mutta biologisten aineiden ollessa kyseessä niiden toimintamekanismit ovat niin monimutkaisia, että yhteisvaikutukset voivat olla odottamattomia. Glutamatergisten ja kolinergisten neuronien tunnistamiseen löytyy muitakin markkereita. Voitaisiin kokeilla esimerkiksi entsyymien tunnistamiseen perustuvia vasta-aineita.

Työ tarjosi myös odottamattomia tuloksia. DREADD-reseptoreita sisältävien neuronien aksonien ei uskottu erottuvan niin hyvin kuin ne erottuivat ja varsinkin 2-prosenttisella Triton x-100 -pitoisuudella käsiteltyjen näytteiden aksonit erottuivat silmiinpistävän hyvin. Aksonien hyvä erottuminen voi tarjota mielenkiintoisia tutkimuksen aiheita jatkossa.

## Lähteet

1. Vardy E, Robinson JE, Li C, Olsen RHJ, DiBerto JF, Giguere PM. 2015. A New DREADD Facilitates the Multiplexed Chemogenetic Interrogation of Behavior. *Neuron*. Vol. 86.
2. Bolam, J.P., Ingham, C.A. and Magill, P.J. 2005. *The Basal Ganglia VIII*. Springer Science and Business Media, New York.
3. E. Garcia-Rill. 2009. Reticular Activating System. *Encyclopedia of Neuroscience*.
4. Gut NK, Winn P. 2016. The pedunculo-pontine tegmental nucleus—A functional hypothesis from the comparative literature. *Mov Disord*. Vol. 31.
5. Daniel J. Urban, Bryan L. Roth. 2014. DREADDs (Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs): Chemogenetic Tools with Therapeutic Utility. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. Vol.55.
6. Debanne D, Daoudal G, Sourdet V, Russier M. 2003 Brain plasticity and ion channels. *Journal of Physiology-Paris*. Vol. 97.
7. Niciu MJ, Kelmendi B, Sanacora G. 2012. Overview of Glutamatergic Neurotransmission in the Nervous System. *Pharmacol Biochem Behav*. Vol. 100.
8. Brian S. Meldrum. 2017. Glutamate as a Neurotransmitter in the Brain: Review of Physiology and Pathology. *The Journal of Nutrition*
9. Choline Acetyltransferase (ChAT) – a useful Immunohistochemical marker for morphological studies of neurons. 2016. Verkkodokumentti. Novusbio. <<https://www.novusbio.com/antibody-news/antibodies/choline-acetyltransferase-chat-a-useful-immunohistochemical-marker-for-morphological-studies-of-neurons>>. Luettu 24.3 2017
10. Strauss WL, Kemper RR, Jayakar P, Kong CF, Hersh LB, Hilt DC. 1991. Human choline acetyltransferase gene maps to region 10q11–q22.2 by in situ hybridization. *Genomics*. Vol. 9.
11. Primary antibody selection optimization. 2016. Verkkodokumentti. Novusbio Oy <<https://www.novusbio.com/primary-antibody-selection-optimization>> Luettu 25.3.2017
12. Gage GJ, Kipke DR, Shain W. Whole Animal Perfusion Fixation for Rodents. *J Vis Exp*. 2012. Verkkodokumentti.<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3476408>> Luettu 3.3.2017
13. Howat WJ, Wilson BA. 2014. Tissue fixation and the effect of molecular fixatives on downstream staining procedures. *Methods*. Vol. 70.

14. IHC Antigen Retrieval Protocol. 2016. Verkkodokumentti. Abcam. <<http://www.abcam.com/protocols/ihc-antigen-retrieval-protocol>>. Luettu 1.4.2017
15. Antigen Retrieval Methods. 2016. Verkkodokumentti. RND Systems. <<https://www.rndsystems.com/resources/protocols/antigen-retrieval-methods>>. Luettu 28.3.2017
16. Chen X, Cho D-B, Yang P-C. 2010. Double staining immunohistochemistry. N Am J Med Sci. Vol. 2.
17. Buchwalow I, Samoilova V, Boecker W, Tiemann M. Non-specific binding of antibodies in immunohistochemistry: fallacies and facts. Verkkodokumentti. Sci Rep. 2011. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3216515/>> Luettu 23.3.2017
18. Bernas, T, Robinson, J P, Asem E K and Rajwa B. 2005. Loss of image quality in photobleaching during microscopic imaging of fluorescent probes bound to chromatin. Journal of Biomedical Optics Vol. 10: 064015
19. Ono M, Murakami T, Kudo A, Isshiki M, Sawada H, Segawa A. 2001. Quantitative Comparison of Anti-Fading Mounting Media for Confocal Laser Scanning Microscopy. J Histochem Cytochem. Vol. 49.
20. Introduction to Fluorescence Microscopy. 2016. Verkkodokumentti. Nikon's MicroscopyU. <<https://www.microscopyu.com/techniques/fluorescence/introduction-to-fluorescence-microscopy>> Luettu 27.3.2017
21. ZEISS Microscopy [CC BY 2.0 (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>)], via Wikimedia Commons
22. Bauch H, Schaffer J. 2006. Optical sections by means of "structural illumination": background and application in fluorescence microscopy. Saksa. Carl Zeiss MicroImaging



**Käytetyt reagenssit ja vasta aineet****Estoliuos**

Naudan albumiiniseerumi	1,0 %
Aasiseerumi	10,0 %
Triton x-100	0,3 %
PBS	88,7 %

**2 % Triton estoliuos**

Naudan albumiiniseerumi	1 %
Aasiseerumi	10 %
Triton x-100	2 %
PBS	87 %

**PFA**

Paraformaldehydi	4 %
vesi	86 %
PBS	10 %

**PBS**

NaCl	0,90 %
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,10 %
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,05 %
vesi	98,95 %

**Primaari vasta-aineet**

goat anti-chat AB144P
mouse anti-VGLUT2 mab5504
rabbit anti-mCherry ab167453

**laimennus**

1:100
1:300
1:800

**per 500 ml**

5 µl
1,7 µl
0,7 µl

**Sekundaari vasta-aineet**

donkey anti-goat 405 ab175664
donkey anti-mouse 488 A-21202
donkey anti-rabbit 594 ab150076

**laimennus**

1:1000
1:1000
1:1000

**per 500 ml**

0,5 µl
0,5 µl
0,5 µl